UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUL 1 60

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

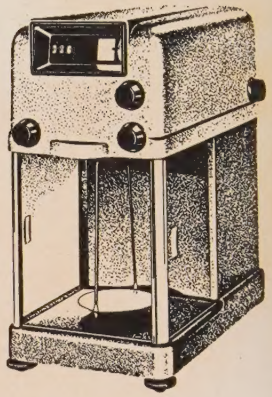
K. Schaffner, D. Arigoni und O. Jeger: Neuartige Umwandlungen bei den Steroiden 169

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

Y. Mazur and F. Sondheimer: 1,4-Carbonyl-Carbonyl Interactions 181
Margaret H. Sherlock, N. Sperber, and J. Topliss: 3-Haloalkyl-Dihydrobenzothiadiazine Dioxides as Potent Diuretic Agents 184
M. B. Lal and S. C. Shrivastava: Some Histochemical Observations on the Cuticle of *Fasciola indica* Verma, 1953 185
H. Braunsteiner, P. Niederberger und S. Sailer: Quantitative Unterschiede der Serummukoproteine bei verschiedenen Spezies 186
H. Baker, O. Frank, I. Pasher, H. Sobotka, H. A. Nathan, S. H. Hutner, and S. Aaronson: Elaboration of Vitamin B_{12} by *Escherichia coli* 187
R. A. Edgren and D. W. Calhoun: Oestrogen Antagonisms: the Effects of Various Steroids on the Uterine Growth Produced in Mice by Oestriol 188
Z. Šormová, K. Šebesta, J. Bauerová, O. Melichar, and F. Šorm: Stimulation of Plant Development by Some Uracil Analogues 189
E. Follenius et A. Porte: Cytologie fine des cellules interstitielles du testicule du poisson *Lebistes reticulatus* R . 190
L. O. Boréus and N. Chakravarty: The Histamine Content of Guinea Pig Mast Cells 192
P. P. Nair: A Crystalline Molybdophosphoric Complex of Folic Acid 193
J. Churý: Über den Phytoöstrogengehalt einiger Pflanzen 194
I. D. Raacke and J. Bové: Notes on the Hydroxamate Assay for Amino Acid Activating Enzymes 195
L. Magos: Effect of the Methemoglobinemie on Heinz Body Formation 197
J. Hirschfeld and U. Söderberg: Autoradiographs of Human Sera Tagged with Radioactive Thyroxine and Investigated in Immuno-electrophoresis 198
H. Povoa, Jr. and G. G. Villela: Transaminase in Seminal Plasma of Man 199
H. Edery and G. Schatzberg-Porath: Some Biological Properties of two Fluoro-Derivatives of Tryptamine . . 200
K. Barta und A. Bartova: Immunologische Eigenschaften der menschl. mit Heparin präzipitierten Plasmafraktion 201
J. P. Shukla and K. A. Prabhu: Studies on Biosynthesis of Sucrose 202
R. Meier und B. Ecklin: Die Wirkung des Hydrocortisons auf die infektionsbedingte lokale Leukozytenansammlung 204
E. Dodt und K. H. Jessen: Depression of Cone Sensitivity During Dark Adaption 205
P. Krupp und M. Monnier: Elektrophysiologische Analyse der Wirkung von Adenochrom auf das Kaninchengehirn 206
J. H. van Roon, A. J. Ch. Haex, W. A. Seeder, and J. de Jong: Clinical and Biochemical Analysis of Gluten Toxicity I 209
L. Angervall, L. Enerbäck, and H. Westling: Urinary Excretion of 5-Hydroxyindoleacetic Acid and Histamine in the Pregnant Rat 209
M. Goldstein, A. J. Friedhoff, and G. Sandler: The Relative Metabolic Rates of Norepinephrine-7-H^3 and Epinephrine-1-C^{14} 211
G. Jasmin, P. Bois, and A. Mongeau: Effect of Cortisol and Norethandrolone on Inflammation and Tumor Growth 212
A. Glässer and P. Mantegazzini: The Action of 5-Hydroxy-DL-Tryptophan and 5-Hydroxy-Tryptamine on the Cortical Electrical Activity of the 'Midpontine Pretrigeminal Preparation' 213
S. R. Guha and H. S. Chakravarti: Glutaminase I Activity in Guinea Pig and Rabbit Liver and Kidney Tissues 214
D. Mazia and Nancy L. R. Bucher: A Method for Avoidance of Electrostatic Flashing in Preparing Autoradiographs with Stripping Film (Pro Experimentis) 215
B. Rybak et M. Burstein: Une combinaison chimique de la fertilisine (Pro Experimentis) 216

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



M 1

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XVI/1

Ciba AG, Basel
The Fellowship of Postgraduate Medicine, London
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy A. G., Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Regis Chemical Company, Chicago
Les Laboratoires Roussel, Paris
Sandoz A. G., Basel

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 68.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 68.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogn libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 68.–. Il prezzo vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is fr. 68.–. Price in Swisscurrency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1959 Birkhäuser Verlag, Basel 10 Schweiz, Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

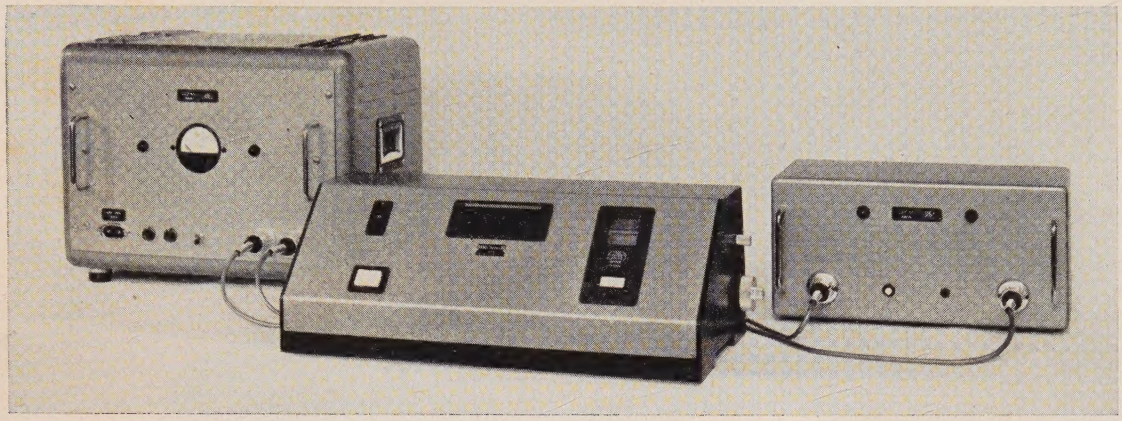
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/C

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75

The Postgraduate Medical Journal

February Issue, 1960

Price 6/6 post free

Contents

Osmolarity Disorders of the Body Fluids
Victor Wynn, M.D.

The Control of Aldosterone Secretion
J. P. Coghlan, B. Sc., D. A. Denton, M. B., B. S., J. R. Goding, M. B., B. S., and R. D. Wright, M. S., D. Sc., F. R. A. C. P.

Water and Electrolyte Metabolism in Congestive Heart Failure
C. T. G. Flear, B. Sc., M. B., Ch. B.

Hypernatraemia
Joan F. Zilva, B. Sc., M. D., M. R. C. P.

Hypernatraemia and Gastro-Enteritis
Donald B. Cheek, M.D., D. Sc.

Pneumonia in Hospital
G. H. Jennings, M. D., F. R. C. P.

March Issue, 1960

Price 6/6 post free

Contents

Islet-Cell Tumours and Peptic Ulceration
James B. Gibson, M. D., M. R. C. P. (Edin.), and Richard B. Welbourn, M. A., M. D. (Camb.), F. R. C. S.

Islet-Cell Tumour of the Pancreas, with Hypoglycaemia
Robert S. Monro, F. R. C. S.

Phaeochromocytoma
J. T. Wright, D. M., M. R. C. P.

Virilizing Syndromes
Ivor H. Mills, Ph. D., M. D., M. R. C. P.

Bilateral Polycystic Ovaries
David Ferriman, D. M., M. R. C. P.

Feminizing Tumours of the Testis
P. Paton Philip, M. Chir., F. R. C. S.

Conn's Syndrome
T. M. Chalmers, M. D., M. R. C. P.

Published by

THE FELLOWSHIP OF POSTGRADUATE MEDICINE
60 Portland Place, London, W. 1.

*

Am Anfang jedes chemischen Produktes steht die Forschung, und zwar

gezielte Forschung

Zufallstreffer sind selten geworden. Ein gut aufeinander abgestimmtes Räderwerk, in dem jeder Forscher Teilaufgaben löst, die näher und näher zum Ziel führen, bis eines Tages der Wurf gelingt, ist heute der einzig gangbare Weg. In den Geigy-Laboratorien führen Hunderte von qualifizierten Mitarbeitern jährlich Zehntausende von Versuchen durch. Dieser hohe Einsatz in gezielter Forschung bürgt dafür, daß Geigy auch in Zukunft bei Verbrauchern in der ganzen Welt auf Vertrauen zählen darf.

Geigy

J.R Geigy A.G., Basel

A 7

EXPERIENTIA

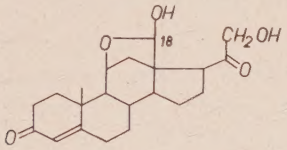
Vol. XVI – Fasc. 5 Pag. 169–216 15. V. 1960

Neuartige Umwandlungen bei den Steroiden[1]

Von K. SCHAFFNER, D. ARIGONI und O. JEGER[2]

1. *Einleitung*

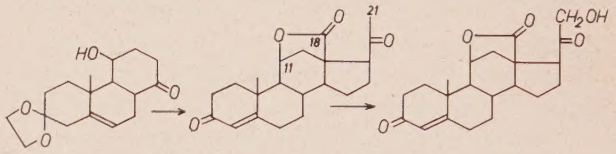
Die chemische Erforschung der lebenswichtigen Nebennierenrinden-Hormone hatte in den letzten Jahren zwei Wege eingeschlagen: einerseits versuchte man, durch Synthese neuer, nicht genuiner Derivate und Homologe zu Verbindungen zu gelangen, die eine im Vergleich zu den natürlichen stark vergrösserte und spezifischere Wirkung besitzen könnten. Auf die sehr stürmische Entwicklung auf diesem Gebiet soll hier nicht eingegangen werden. Anderseits versuchte man,



1

aus den sogenannten amorphen Fraktionen der Nebennierenrinden-Extrakte mittels verfeinerter Isolationstechnik neue Inhaltstoffe zu finden. Diese Arbeiten führten 1953 zur Isolierung des *nat.*-Aldosterons (**1**)[3], dessen Konstitution von REICHSTEIN und WETTSTEIN[4] aufgeklärt wurde. Der wesentliche Unterschied gegenüber den bisher bekannten Hormonverbindungen besteht darin, dass im Fall des Aldosterons die Methylgruppe C-18 des Steroidgerüstes Träger einer Sauerstoff-Funktion ist. Dieses Merkmal bildete ausser der Tatsache, dass Aldosteron in nur sehr geringen Mengen aus den tierischen Geweben isoliert werden kann, einen zusätzlichen Anreiz zum Versuch, die Verbindung auf geeigneten synthetischen Wegen zugänglich zu machen.

In die Bewältigung dieser komplexen Aufgabenstellung teilten sich anfänglich die Arbeitsgruppen der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, der Anstalt für organische Chemie der Universität Basel, der N. V. Organon, Oss, und des organisch-chemischen Laboratoriums der ETH, Zürich. In der Folge gelang es in den Jahren 1955–1956 der CIBA-Gruppe, *rac.*-Aldosteron[5] und schliesslich auch das optisch reine *nat.*-Aldosteron[6] auf totalsynthetischem Weg herzustellen. Ausgehend von dem racemischen, von SARETT beschriebenen Keton **2** wurde die Verbindung **3**[7] synthetisiert, die nach Hydroxylierung der Methylgruppe C-21 und reduktiver Umwandlung der C-18 → C-11-Lacton-Gruppierung racemisches Aldosteron lieferte. Ausserdem wurde gefunden, dass bei der mikrobiologischen Hydroxylierung der Stellung 21 nur die Hälfte des Racemates **3** stereospezifisch umgesetzt wurde und das Produkt **4** in der optisch reinen *nat.*-Form anfiel. Damit war auch eine Totalsynthese von natürlichem Aldosteron erschlossen worden[8].



2 3 4

[1] Erweiterte Fassung eines am 6. 5. 59 in der Zürcher Chemischen Gesellschaft sowie am 11. 6. 59 in der CIBA AG., Basel, vom Seniorautor gehaltenen Vortrages.

[2] Organ.-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

[3] S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW und T. REICHSTEIN, Experientia *9*, 333 (1953). – S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta *37*, 1163 (1954). – Vgl. ferner V. R. MATTOX, H. L. MASON, A. ALBERT und C. F. CODE, J. Amer. chem. Soc. *75*, 4869 (1953). – V. R. MATTOX und H. L. MASON, J. biol. Chem. *223*, 215 (1956). – R. E. HARMAN, E. A. HAM, J. J. DE YOUNG, N. G. BRINK und L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. *76*, 5035 (1954).

[4] S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, Experientia *10*, 132 (1954); Helv. chim. Acta *37*, 1200 (1954). – Vgl. ferner E. A. HAM, R. E. HARMAN, N. G. BRINK und L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1637 (1955).

[5] J. SCHMIDLIN, G. ANNER, J.-R. BILLETER und A. WETTSTEIN, Experientia *11*, 365 (1955). – J. SCHMIDLIN, G. ANNER, J.-R. BILLETER, K. HEUSLER, H. UEBERWASSER, P. WIELAND und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *40*, 1034, 1438, 2291 (1957).

[6] E. VISCHER, J. SCHMIDLIN und A. WETTSTEIN, Experientia *12*, 50 (1956).

[7] Bei racemischen Produkten werden im folgenden der Einfachheit halber lediglich die Formelbilder der *nat.*-Enantiomeren wiedergegeben.

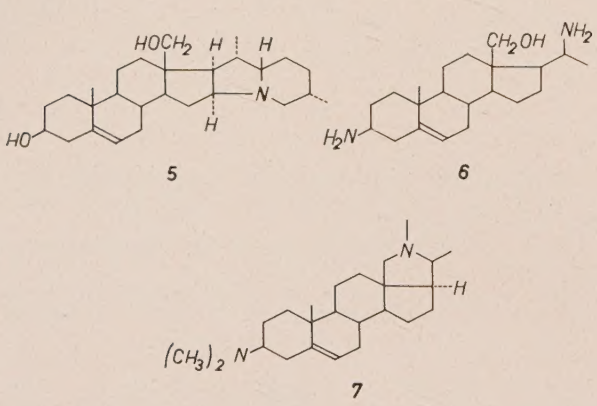
[8] *nat.*-Corticosteron-18-säure-lacton-(18→11) (**4**) war schon früher durch Oxydation von *nat.*-Aldosteron hergestellt und wieder in letzteres zurückgeführt worden; vgl. J. VON EUW, R. NEHER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta *38*, 1423 (1955).

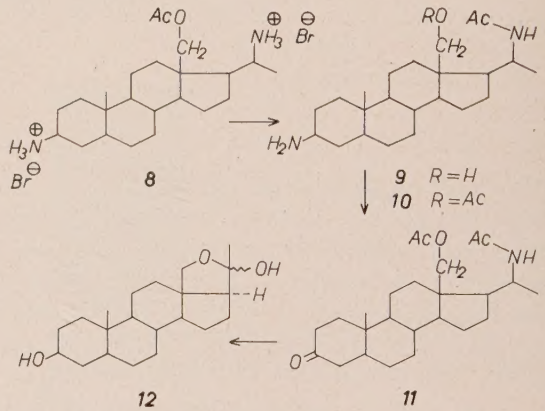
In zwei weiteren Fällen, ebenfalls vom tricyclischen Keton **2** ausgehend, verwirklichten kurz darauf LARDON, SCHINDLER und REICHSTEIN[9] sowie die ORGANON-Gruppe[10] modifizierte Synthesen des *rac.*-Lactons **4**. HEUSLER, WIELAND und WETTSTEIN[11] führten ferner im Rahmen desselben totalsynthetischen Konzepts noch wesentliche Verbesserungen und Vereinfachungen ein. Schliesslich wurde von JOHNSON *et al.*[12] eine von den bereits besprochenen Varianten grundsätzlich verschiedene Totalsynthese von *rac.*-Aldosteron erschlossen, der ein Perhydrochrysen-Derivat als Ausgangssubstanz diente.

2. *Gewinnung von 18-Hydroxy-progesteron aus Holarrhena-Alkaloiden und weitere Syntheseversuche*

Da für die unnatürliche Form des Aldosterons wie auch für die unnatürlichen Antipoden aller andern synthetisch bereiteten Steroide bis anhin noch keine Verwendung gefunden wurde, schien es von vornherein wünschenswert, die sehr umfangreichen Arbeiten einer Totalsynthese zu vermeiden und statt dessen die Darstellung von *nat.*-Aldosteron auf partialsynthetischem Weg aus leicht zugänglichen Naturstoffen zu ermöglichen. Solche Naturstoffe liegen in den Steroidalkaloiden Isorubijervin (**5**), Holarrhimin (**6**) und Conessin (**7**) vor, die in Stellung 18 bereits mit einem Heteroatom substituiert sind. Es war daher naheliegend, dass verschiedene Arbeitsgruppen Versuche unternahmen, diese Naturprodukte durch geeignete Abbaureaktionen in Steroidverbindungen des gewünschten Typus umzuwandeln. Entsprechende Arbeiten an Isorubijervin (**5**) zeitigten bisher noch keine brauchbaren Resultate[13]. Hingegen konnten sowohl das Holarrhimin (**6**) als auch das Conessin (**7**) mittels verschiedener Reaktionsfolgen in stickstoffreie 18-Hydroxy-Steroide umgewandelt werden.

LÁBLER und ŠORM[14] gingen zu diesem Zweck vom Dihydrobromid des 5,6-Dihydro-holarrhimins aus, dessen Acetylierung zum Mono-O-acetyl-dihydrobromid **8** führte. Da beim Versuch, aus **8** die freie Base zu isolieren, die O-Acetylgruppe zum benachbarten Stickstoff wanderte (**9**), wurde es notwendig, die zur Darstellung des 3β,18-Dihydroxy-20-keto-5α-pregnans (**12**) erforderliche Umwandlung der beiden Stickstoff- in Sauerstoff-Funktionen in getrennten Schritten vorzunehmen. Das durch partielle Acetylierung von **9** erhaltene 18,20-Di-O,N-acetyl-Derivat **10** wurde nach der von RUSCHIG[15] entwickelten Methode in das Ring-A-Keton **11** übergeführt. Nach der Reduktion dieses Zwischenproduktes **11** zum 3β-Alkohol und der hydrolytischen Entfernung der Acetatgruppen lieferte eine zweite RUSCHIG-Reaktion das 3β,18-Dihydroxy-20-keto-5α-pregnan, welches nach den IR-spektroskopischen Befunden in Form des (18 → 20)-Halbacetals **12** vorliegt. Indem dieselben Autoren Holarrhimin (**6**) als Ausgangsmaterial für eine im wesentlichen analoge Reaktionsfolge verwendeten[16], gelang es ihnen, 3β,18-Dihydroxy-20-keto-Δ^5-pregnen (**13**) herzustellen. Das daraus zugängliche 20-Methoxy-Derivat **14** erleichterte die selektive Oxydation des Hydroxyls in Stellung 3. Anschliessende saure Hydrolyse führte zu 18-Hydroxy-progesteron, das ebenfalls in Form eines (18 → 20)-Halbacetals (**15**) vorliegt.





[9] A. LARDON, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta *40*, 666 (1957).

[10] S.A. SZPILFOGEL, W.J. VAN DER BURG, C.M. SIEGMANN und D.A. VAN DORP, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *75*, 1043 (1956); *77*, 157 (1958).– W.J. VAN DER BURG, D.A. VAN DORP, O. SCHINDLER, C.M. SIEGMANN und S.A. SZPILFOGEL, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *77*, 171 (1958).

[11] K. HEUSLER, P. WIELAND und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *42*, 1586 (1959).

[12] W.S. JOHNSON, J.C. COLLINS, R. PAPPO und M.B. RUBIN, J. Amer. chem. Soc. *80*, 2585 (1958).

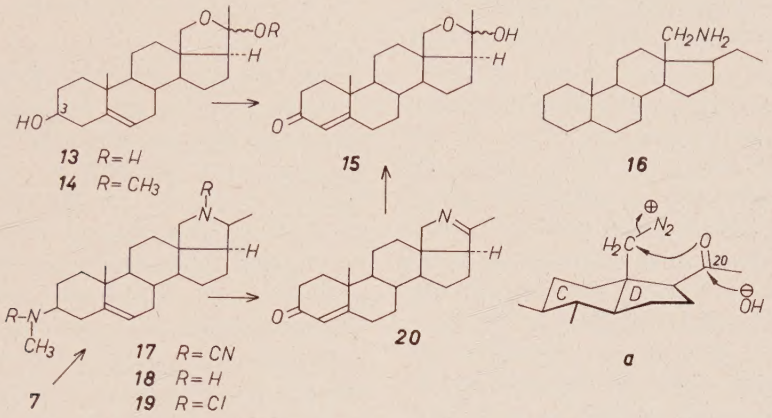
[13] Unveröffentlichte Versuche in unserem Laboratorium, an denen sich seit 1954 die Herren P. BUCHSCHACHER, G. CAINELLI, F. GREUTER, J. KALVODA, B. KAMBER, F. KAPLAN, J. KELLER und E.C. UTZINGER beteiligt haben.

[14] L. LÁBLER und F. ŠORM, Chem. & Ind. *1958*, 1661.

[15] H. RUSCHIG, W. FRITSCH, J. SCHMIDT-THOMÉ und W. HAEDE, Ber. dtsch. chem. Ges. *88*, 883 (1955).

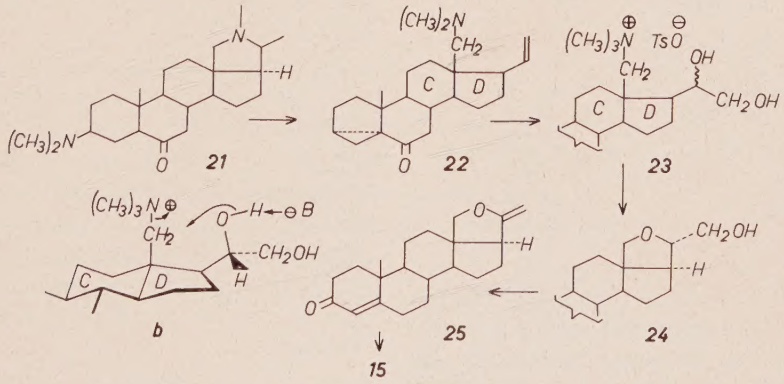
[16] L. LÁBLER und F. ŠORM, Chem. & Ind. *1959*, 598.

Die Überführung des Conessins (**7**) in 18-oxygenierte Steroide bot wesentlich grössere Schwierigkeiten. Während HAWORTH *et al.*[17] vergeblich versucht hatten, durch Einwirkung von salpetriger Säure auf das durch mehrstufigen Abbau des Alkaloids zugängliche 18-Amino-5α-pregnan (**16**) die 18-Hydroxy-Verbindung zu erhalten, gelang es MCNIVEN[18] erstmals, mittels der Sommelet-Reaktion[19], die als Teil eines Neopentylsystems vorliegende Aminomethyl-Gruppe von **16** in die entsprechende 18-Formyl- und 18-Hydroxymethyl-Gruppierung umzuwandeln.



Im Gegensatz zu diesen im Hinblick auf die Aldosteron-Synthese uninteressanten Verbindungen gelang es gleichzeitig PAPPO[20] und unserer Arbeitsgruppe[21], aus Conessin (**7**) 18-Hydroxy-progesteron (**15**) herzustellen unter Anwendung von Reaktionen, welche die Oxygenierung in Stellung 18 durch intramolekulare Unterstützung von geeigneten Substituenten an C-20 und Hydrolyse in Stellung 3 unter Bildung von 18,20-Imino-3-keto-$\Delta^{4;\,20,\,N}$-pregnadien (**20**) erreicht. Die Behandlung von **20** mit salpetriger Säure führte zur Halbketalform **15** von 18-Hydroxy-progesteron. Der glatte Verlauf dieser Reaktion mag dadurch erklärt werden, dass die Elimination von Stickstoff seitens der benachbarten 20-Ketogruppe intramolekular assistiert wird (vgl. **a**)[22].

Der von PAPPO[20] eingeschlagene, bedeutend längere Weg verlief über insgesamt 15 Zwischenstufen. Er umfasste eine Hofmann-Reaktion der beiden Stickstoff-Funktionen von 6-Keto-dihydro-conessin (**21**) zum 3,5-Cyclo-18-dimethylamino-Δ^{20}-Derivat **22**. Hydroxylierung der Doppelbindung des quaternären Trimethylammonium-Salzes von **22** führte zu einem Gemisch von an C-20 epimeren Dihydroxy-Verbindungen **23**, deren quaternäres Stickstoffatom eine zweite Hofmann-Reaktion einging. Wegen der Abwesenheit eines Was-



bewirkten. Die ETH-Gruppe[21] löste diese Aufgabe in einer fünfstufigen Reaktionsfolge, in der sie Conessin (**7**) nach der von Braun-Methode über die N,N'-Dicyan-Verbindung **17** in den Naturstoff Conimin (**18**) überführte und dessen N,N'Dichlor-Derivat **19** einer basischen Behandlung unterwarf. Dadurch wurde die Abspaltung von zwei Chlorwasserstoff-Äquivalenten

[17] H. FAVRE, R. D. HAWORTH, J. MCKENNA, R. G. POWELL und G. H. WHITFIELD, J. chem. Soc. *1953*, 1115.

[18] N. L. MCNIVEN, Chem. & Ind. *1957*, 1296.

[19] Vgl. S. J. ANGYAL und R. C. RASSACK, J. chem. Soc. *1949*, 2700.

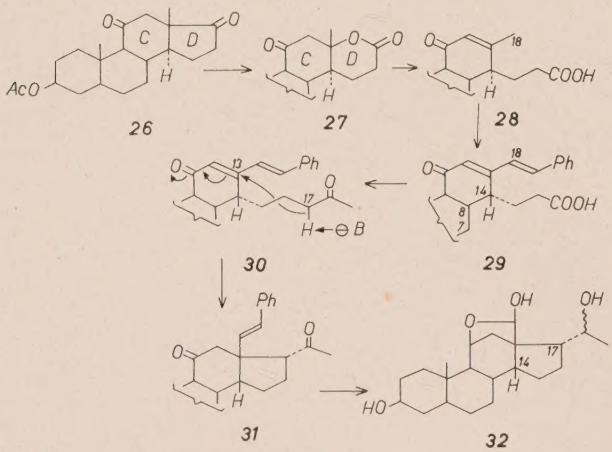
[20] R. PAPPO, J. Amer. chem. Soc. *81*, 1010 (1959).

[21] F. BUZZETTI, W. WICKI, J. KALVODA und O. JEGER, Helv. chim. Acta *42*, 388 (1959).

[22] Vgl. A. T. AUSTIN und J. HOWARD, Chem. & Ind. *1959*, 1413, die einen analogen Mechanismus für die Desaminierung von Glutamin mit salpetriger Säure zu 4-Carboxy-γ-butyrolacton vorschlagen.

serstoffatoms an dem zum Stickstoff β-ständigen Kohlenstoff findet dabei eine ungewöhnliche Reaktion statt, indem die räumlich benachbarte 20-Hydroxygruppe als Elektronendonator auftritt (vgl. **b**)[23], so dass gleichzeitig mit der Elimination von Trimethylamin ein Äther-Ringschluss zwischen C-18 und C-20 erzielt und so als Hauptprodukt die Verbindung **24** erhalten wurde. Diese liess sich in das entsprechende 21-Dimethylamino-Derivat überführen und lieferte weiter durch schrittweise Reduktion, Isomerisierung und Oxydation im Bereich der Ringe A und B und nachfolgende Abspaltung der 21-Dimethylamino-Gruppe den Vinyläther **25**. 18-Hydroxy-progesteron (**15**) war aus dieser Verbindung durch Hydratation mit verdünnter Säure leicht zugänglich.

Die auf HEUSSER, ANLIKER *et al.*[24] zurückgehenden Arbeiten, die durch Aufspaltung des Ringes D eine Aktivierung des Kohlenstoffatoms 18 zu erzielen und damit Substitutionsreaktionen an demselben zu ermöglichen trachteten, führten bisher nicht zu brauchbaren Zwischenprodukten für eine Partialsynthese des Aldosterons. Zwar glückte BARTON *et al.*[25] in Erweiterung dieser Untersuchungen die Einführung des (11 → 18)-Halbacetal-Systems, doch bot die Tatsache, dass der Ringschluss zwischen den Kohlenstoffatomen 13 und 17 zur unnatürlichen *cis*-Verknüpfung der Ringe C und D führt, sehr ungünstige Voraussetzungen für eine



Weiterführung dieser Variante. Ausgehend von 3β-Acetoxy-11,17-diketo-androstan (**26**) war es den Autoren gelungen, über das Sechsring-Lacton **27** das 13,17-seco-Steroid **28** herzustellen. Die in dieser Verbindung bereits aktivierte Methylgruppe 18 ging eine Aldolkondensation mit Benzaldehyd ein, wobei unter den basischen Reaktionsbedingungen infolge sterischer Hinderung gleichzeitig die Seitenkette in Stellung 14 von der äquatorialen in die axiale Lage isomerisiert wurde (**29**). Nach Verlängerung der Seitenkette um zwei Kohlenstoffatome (**30**) erfolgte der basisch katalysierte Ringschluss zum tetracyclischen Derivat **31**, aus dem durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid und nachfolgende Ozonisation die 14,17-iso-Pregnanverbindung **32** resultierte. Da es formal denkbar ist, dass die unnatürliche Verbindung **32** in eine solche mit natürlicher Konfiguration des Kohlenstoffatoms 14 übergeführt werden könnte[26], scheint es möglich, das Aldosteron nach diesem Verfahren herzustellen. Eine solche Partialsynthese dürfte jedoch kaum von praktischer Bedeutung werden.

3. *Neuartige Substitutionsreaktionen an der Methylgruppe 18 im intakten Steroidgerüst*

Die von den Steroidalkaloiden Holarrhimin und Conessin ausgehenden Partialsynthesen führen ausschliesslich zu 18-oxygenierten Steroiden ohne die wichtige Sauerstoff-Funktion in Stellung 11. Allerdings könnten prinzipiell in Produkten vom Typus des 18-Hydroxy-progesterons diese fehlende Funktion nachträglich mittels mikrobiologischer Oxydation eingeführt werden. Wegen der durchweg grossen Anzahl Reaktionsstufen sowie der Tatsache, dass lediglich Conessin leicht zugänglich ist, erschienen diese Methoden jedoch wenig attraktiv für eine industrielle Verwertung. Daher suchte unsere Arbeitsgruppe von Anfang an nach *neuartigen* partialsynthetischen Methoden, die auf einer breiteren Basis eine *direkte und selektive Substitution der reaktionsträgen Methylgruppe 18 von intakten Steroiden* erlauben, in welchen die Stellung 11 bereits eine mindestens potentielle Sauerstoff-Funktion trägt. Ein solcher Reaktionsmodus ist auch von grossem allgemeinem Interesse. Das Kohlenstoffatom 18 ist nämlich Teil eines Neopentylsystems (vgl. Partialformel **c**) und als solches im üblichen Sinne nicht aktivierbar infolge der blockierenden Wirkung des zentralen Atoms 13.

Die dargelegte Problemstellung eines gezielten Angriffs an einem nicht aktivierten Kohlenstoffatom erinnert an den intermolekularen Verlauf enzymatisch gesteuerter Vorgänge, die zweifellos durch geeignete Fixierung von Substrat und Reagens ermöglicht werden, welche zu einer wesentlichen Herabsetzung der erforderlichen Aktivierungsenergie führt. So konnten WETTSTEIN *et al.*[27] 1955 erstmals über eine biochemische Oxydation der Methylgruppe 18 von Cortexon

[23] Einen ähnlichen Mechanismus postulierte bereits HAWORTH[17] für den ungewöhnlich verlaufenden Hofmann-Abbau bei einigen Derivaten der Holarrhena-Alkaloide.

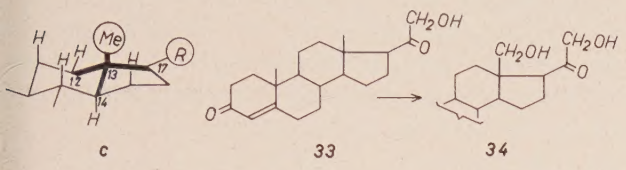
[24] H. HEUSSER, J. WOHLFAHRT, M. MÜLLER und R. ANLIKER, Helv. chim. Acta *38*, 1399, 1404 (1955); *42*, 2140 (1959).

[25] D. H. R. BARTON, A. DA S. CAMPOS-NEVES und A. I. SCOTT, J. chem. Soc. *1957*, 2698.

[26] Vgl. z. B. H. HEUSSER, M. ROTH, O. ROHR und R. ANLIKER, Helv. chim. Acta *38*, 1178 (1955).

[27] F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *38*, 1237 (1955). – Vgl. auch S. ULICK und S. SOLOMON, J. Amer. chem. Soc. *82*, 249 (1960).

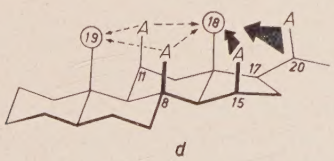
(**33**) zur entsprechenden 18-Hydroxy-Verbindung **34** berichten. Bei der aeroben Inkubation von **33** mit Nebennieren-Homogenaten von Rindern konnte dieses Produkt nebst dem bereits bekannten 19-Hydroxycortexon[28] in allerdings noch keineswegs präparativem Maßstab isoliert werden.



c 33 34

In vitro ist eine direkte Substitution an der Methylgruppe 18 nur durch solche intramolekulare Reaktionen realisierbar, die zu einer C–H-Spaltung an Alkanen befähigt sind. Dieses Ziel zu erreichen wurde durch eine zweckmässige Ausnützung der spezifischen Geometrie des Moleküls versucht in dem Sinne, dass die Position des reaktiven Zentrums in nächster Nähe zu C-18 gewählt wurde. Die massgebende Rolle einer räumlichen Fixierung der Reaktionszentren bei chemischen intramolekularen Vorgängen ist schon wiederholt betont worden[29]. Wohlbekannte Erscheinungen dieser Art sind sowohl die spontane Lactonisierung von γ- und δ-Hydroxycarbonsäuren wie auch die transannularen Hydridverschiebungen bei mittleren Ringen, wie sie von PRELOG und COPE an Hand zahlreicher Beispiele nachgewiesen worden sind[30]. In die gleiche Kategorie gehören auch die transannularen 1,3-Wanderungen, die von ROBERTS und WINSTEIN[31] an einigen Bicyclo-[1,2,2]-heptan-Systemen eingehend untersucht worden sind.

Als Ausgangsprodukte für die Ausarbeitung direkter Substitutionsmethoden wurden im Hinblick auf die Struktur des Aldosterons durchweg Steroide mit Pregnangerüst verwendet. Bei der Modellbetrachtung von Verbindungen dieses Typus wird ersichtlich, dass ein selektiver Angriff auf die Methylgruppe 18 nur von Substituenten an C-15 und C-20 sowie vom Kohlenstoffatom 20 selbst her erfolgen kann (vgl. Partialformel **d**, A = mögliche Angriffszentren). Die besondere symmetrische Lage der Stellungen 8 und 11 zu den beiden Methylgruppen 18 und 19 liess hingegen keine Selektivität der Reaktionsrichtung erwarten.



d

Während Steroide mit Substituenten in Stellung 15 nur schwer zugänglich sind, stehen solche mit funktionellen Gruppen an C-20 der Seitenkette in beliebigen Mengen zur Verfügung, so dass sich deren Wahl als Ausgangssubstanzen direkt aufdrängte. Um so mehr, als die Reaktion eines an C-20 gebundenen Heteroatoms mit der Methylgruppe 18 zu Verbindungen führen sollte, die in Stellung 20 bereits eine potentielle Carbonylgruppe enthalten.

Unter den wenigen, bereits bekannten intramolekularen Substitutions-Reaktionen, welche die gewünschte Cyclisation zwischen der an C-20 substituierten Pregnan-Seitenkette und C-18 herbeiführen könnten, war speziell die Hofmann-Löffler-Freytag-Reaktion von grossem Interesse. Der durch Einwirkung von 85%iger Schwefelsäure auf N-Halogen-Derivate und anschliessende alkalische Behandlung eintretende Ringschluss zwischen dem Stickstoff- und einem nicht aktivierten Kohlenstoffatom war ursprünglich von HOFMANN[32] am Beispiel des N-Bromconiins gefunden worden, welches dabei, wie später LELLMANN[33] vorschlug und LÖFFLER[34] schliesslich bewies, die tertiäre Base Indolizin lieferte. LÖFFLER *et al.*[35] unterzogen in der Folge diese Reaktion einer eingehenden Untersuchung. Sie konnten zeigen, dass ihr eine allgemeine Bedeutung zur Darstellung von Pyrrolidin-Derivaten zukommt, indem in beinahe allen bisher bekannten Fällen auch bei einer bestehenden Möglichkeit zur Ausbildung eines Sechsringes der Ringschluss zu fünfgliedrigen Heterocyclen dominiert[36]. Diese Cyclisationsmethode hat inzwischen schon verschiedentlich Anwendung für synthetische Zwecke gefunden[37].

Die Übertragung der Hofmann-Löffler-Freytag-Reaktion auf geeignete N-Chlor-20-amino-Steroide öffnete unserer Arbeitsgruppe[38] einen Weg zur Partialsynthese von Verbindungen des Conanin-Typus. Damit

[28] G. W. BARBER und M. EHRENSTEIN, J. Amer. chem. Soc. *76*, 2026 (1954).

[29] Vgl. R. B. WOODWARD in *Perspectives in Organic Chemistry* (Interscience Publishers, London 1956), p. 155.

[30] Vgl. V. PRELOG, Exper. Suppl. *7*, 261 (1957).

[31] Vgl. L. RUZICKA in *Perspectives in Organic Chemistry* (Interscience Publishers, London 1956), p. 265.

[32] A. W. HOFMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. *18*, 5, 109 (1885).

[33] E. LELLMANN, Liebigs Ann. *259*, 193 (1890).

[34] K. LÖFFLER und H. KAIM, Ber. dtsch. chem. Ges. *42*, 94 (1909).

[35] K. LÖFFLER und C. FREYTAG, Ber. dtsch. chem. Ges. *42*, 3427 (1909). – K. LÖFFLER und S. KOBER, Ber. dtsch. chem. Ges. *42*, 3431 (1909). – K. LÖFFLER, Ber. dtsch. chem. Ges. *43*, 2035 (1910).

[36] Als Ausnahme dieser Regel ist der Ringschluss von N-Chlor-N-methyl-cyclooctyl-amin zu N-Methyl-granatonin von S. WAWZONEK und P. J. THELEN, J. Amer. chem. Soc. *72*, 2118 (1950), beschrieben. Ausserdem können nach S. WAWZONEK, M. F. NELSON, JR. und P. J. THELEN, J. Amer. chem. Soc. *73*, 2806 (1951), und R. LUKEŠ und M. FERLES, Coll. Czech. chem. Comm. *20*, 1227 (1955), aus 1-Chlor-4-äthyl-piperidin-Verbindungen je nach Reaktionsbedingungen Sechsring- (Chinuclidin-Derivate) oder Fünfring-Produkte (7-Methyl-1-aza-bicyclo-[1,2,2]-heptan-Derivate) isoliert werden.

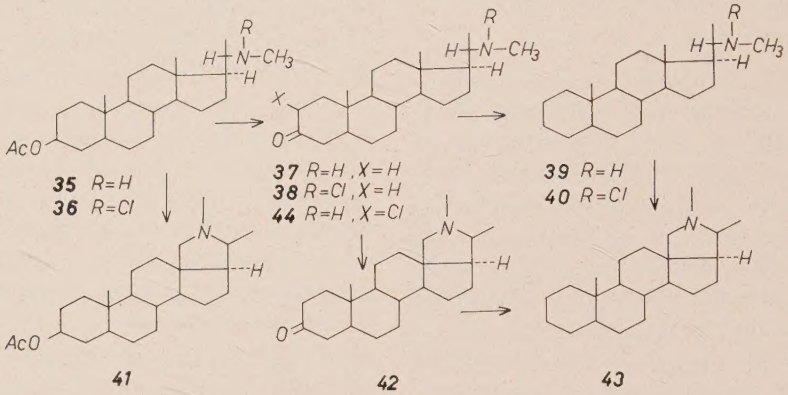
[37] Vgl. z. B. G. MENSCHIKOFF, Ber. dtsch. chem. Ges. *69*, 1802 (1936). – G. H. COLEMAN und G. E. GOHEEN, J. Amer. chem. Soc. *60*, 730 (1936). – G. H. COLEMAN, G. NICHOLS und T. F. MARTENS, Org. Synth. *25*, 14 (1945). – F. ŠORM und J. BRANDEJS, Coll. Czech. chem. Comm. *12*, 444 (1947).

[38] P. BUCHSCHACHER, J. KALVODA, D. ARIGONI und O. JEGER, J. Amer. chem. Soc. *80*, 2905 (1958).

wurde in Verbindung mit der bereits besprochenen Überführung des Conessins (**7**) in 18-Hydroxy-progesteron (**15**)[20,21] erstmals eine Methode erschlossen, die Steroide mit intaktem tetracyclischem Kohlenstoffgerüst mittels direkter Substitution der Methylgruppe 18 in 18-oxygenierte Derivate umzuwandeln erlaubt.

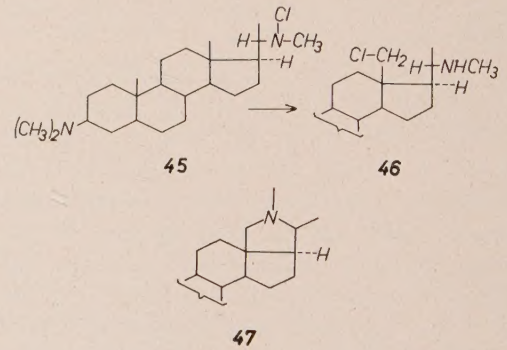
Als Ausgangssubstanzen für die Cyclisation wurden (20*S*)-3β-Acetoxy-20-methylamino-5α-pregnan (**35**)[39,40] und die mittels bekannter Reaktionen daraus zugänglichen Verbindungen **37** und **39** verwendet. Die Zermere 18-Chlor-Verbindung **46** übergeführt und diese in der darauffolgenden alkalischen Behandlung zu **47** cyclisiert[43].

Der Mechanismus der Hofmann-Löffler-Freytag-Reaktion kann auch unter Berücksichtigung der zusätzlichen Beobachtungen, die aus der Übertragung dieser Methode auf Steroidverbindungen folgten, noch nicht restlos abgeklärt werden. Die Befunde, dass die Reaktion bei der Einwirkung von Peroxyden, ultraviolettem Licht in oder ohne Gegenwart von Chlor[44]



setzung des N-Chlor-Derivates **40** mit einem Essigsäure-Schwefelsäure-Gemisch ergab das tertiäre Amin **43**, welches auch durch den Abbau von Conessin (**7**) erhalten wurde und daher als das bis anhin noch unbekannte Conanin identifiziert werden konnte. Dieselbe Ringschluss-Reaktion liess sich auch zur Darstellung von sauerstoffhaltigen Derivaten des Conanins auswerten. So lieferte die analoge Behandlung der N-Chlor-Verbindung **36** 3β-Acetoxy-conanin (**41**). Der Ringschluss zu 3-Keto-conanin (**42**), einem Zwischenprodukt der Überführung von Conessin (**7**) in Conanin (**43**), gelang allerdings in nur minimer Ausbeute durch Behandlung des N-Chlor-Derivates **38** mit Essigsäure-Schwefelsäure-Gemisch. Dank einer Privatmitteilung von Professor E. J. COREY, der uns freundlicherweise auf die beschleunigende Wirkung katalytischer Mengen von Eisen(II)-sulfat auf die Hofmann-Löffler-Freytag-Reaktion aufmerksam machte, konnten die Ausbeuten der Cyclisation zu Conanin (**43**) und 3β-Acetoxy-conanin (**41**) in Anwesenheit dieses Katalysators wesentlich gesteigert werden. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen liess sich hingegen das 3-Keto-chloramin **38** nicht cyclisieren. Statt dessen wurde in erheblichem Ausmass eine intermolekulare Chlorierung an der durch die Ketogruppe aktivierten Methylengruppe 2 zur Verbindung **44** beobachtet[13].

Unter Anwendung des gleichen Syntheseprinzips erreichten COREY und HERTLER[41] eine Partialsynthese von Dihydro-conessin (**47**). In der Schlüsselreaktion dieser im gleichen Zeitraum ausgeführten Arbeit wurde das N-Chlor-Derivat **45**[42] durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht in 90%iger Schwefelsäure in die iso- und von Eisen(II)-sulfat[45] im allgemeinen beschleunigt wird, erlauben die Interpretation derselben als ein Radikalvorgang. Doch gestatten weder die Isolierung des 18-Chlor-Steroidderivates **46**[41] und analoger Reaktionszwischenprodukte aus aliphatischen Verbindun-



[39] Zur konfigurativen Bezeichnung von 20-substituierten Pregnanderivaten vgl. B. KAMBER *et al.*[72]

[40] Zur Darstellung von (20 *S*)-3β-Acetoxy-20-methylamino-5α-pregnan (**35**) aus 3β-Acetoxy-20-keto-5α-pregnan vgl. P. BUCHSCHACHER *et al.*[38]

[41] E. J. COREY und W. R. HERTLER, J. Amer. chem. Soc. *80*, 2903 (1958). – *81*, 5209 (1959).

[42] Zur Darstellung von (20*S*)-N-Chlor-3β-dimethylamino-20-methylamino-5α-pregnan (**45**) vgl. E. J. COREY *et al.*[41]

[43] W. R. HERTLER und E. J. COREY, J. org. Chem. *24*, 572 (1959), fanden nachträglich mit dem Ringschluss von N-Chlorcamphidin zu Cyclo-camphidin ein weiteres Beispiel der Leistungsfähigkeit dieser Substitutionsreaktion an nicht aktivierten Kohlenstoffatomen.

[44] Vgl. dagegen S. WAWZONEK und P. J. THELEN[36].

[45] Privatmitteilung von Prof. E. J. COREY, sowie P. BUCHSCHACHER *et al.*[38].

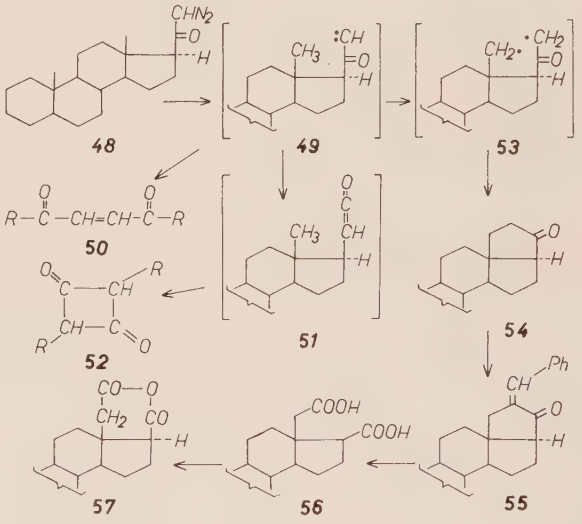
gen[46] noch das Auftreten von Nebenprodukten wie dem 2-Chlor-keton **44**[38,13] eine endgültige Entscheidung über die Natur des Reaktionsablaufs[44].

Nachdem eine intramolekulare Methode zur direkten Einführung von Heteroatomen in Stellung 18 der Steroide gefunden worden war, erschien ein Versuch attraktiv, unter Ausnützung ähnlicher Faktoren zur Lenkung der Reaktion eine direkte Alkylierung von C-18 zu erreichen. Die Wahl der aussichtsreichsten Alkylierungs-Reaktion entfiel auf die Einwirkung von Carbenen auf die C–H-Bindungen der Methylgruppe 18 in der Hoffnung, dass die grosse, im allgemeinen aber wenig selektive Reaktionsfreudigkeit dieser Spezies durch die sterischen Verhältnisse im Bereiche des Ringes D zugunsten der gewünschten Cyclisation beeinflusst würde. Unter den mannigfaltigen Reaktionsmöglichkeiten, welche den meist durch Spaltung von Diazoverbindungen herstellbaren Carbenen offen stehen, waren im Rahmen der beabsichtigten Alkylierung besonders jene Umsetzungen zu berücksichtigen, in welchen nicht aktivierte C–H-Bindungen angegriffen werden. Nebst der grossen Zahl von beschriebenen Carbenreaktionen mit aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen[47] waren nur wenige Angaben über intramolekulare Vorgänge dieser Art bekannt, wie zum Beispiel die Umwandlung des Diazocamphers zum β-Pericyclo-camphanon[48,49]. Ferner war auch mit anderweitigen Reaktionsmodi der Carbene zu rechnen, vor allem mit Dimerisationen[50] und intermediären Umlagerungen zu Ketenverbindungen[51].

Als Ausgangsmaterial für die entsprechenden Experimente in der Steroidreihe wurde das aus Allo-ätiansäure leicht zugängliche Diazoketon **48** verwendet[52,13], welches in verschiedenen Versuchsreihen der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, der thermischen Zersetzung in siedendem Toluol in Gegenwart von Kupferoxyd sowie der trockenen Pyrolyse unterworfen wurde. Das intermediär entstehende Carben **49** führte zu einer Vielfalt von Verbindungen, deren Struktur bisher in 3 Fällen zuverlässig bestimmt werden konnte. So gelang es, zwei Produkte, **50** und **52**, zu fassen, die offensichtlich durch Dimerisierung zweier Carbene (**49**) bzw. durch symmetrische Anlagerung von zwei infolge Wolffscher Umlagerung von **49** entstandenen Ketenen (**51**) gebildet worden waren. Beim dritten Produkt liessen die IR-spektroskopischen Daten das Vorliegen eines Fünfring-Ketons erkennen. Auf Grund der Bildung der Monobenzylidenverbindung **55**, die sich oxydativ zur zweibasischen Säure **56** öffnen und weiter in das Sechsring-Anhydrid **57** umwandeln liess, wurde für das Keton die Struktur **54** postuliert.

Die selektive Substitution an C-18 durch eine Carbengruppe, der wohl eine Isomerisierung zum 18,21-Diradikal **53** vorausgeht und durch Rekombination der beiden Radikalstellen erreicht wird, ist zwar in theoretischer Hinsicht von Interesse, doch dürfte sie infolge der vorläufig geringen Ausbeuten kaum präparative Bedeutung erlangen.

Die Beobachtung, dass bei der Bestrahlung gewisser Steroidketone mit ultraviolettem Licht tertiäre Alkohole ausgebildet werden[13], gab schliesslich Anlass, nach neuen photochemischen Methoden zu suchen, die ebenfalls einen direkten Angriff an der Methylgruppe 18 gestatten. Die präparative Strahlenchemie, die erst am Anfang ihrer Entwicklung steht, repräsentiert nämlich eine reichhaltige Quelle neuer Reaktionsmöglichkeiten und gestattet die Bildung von sonst schwierig synthetisierbaren Systemen. Trotz des Mangels an detaillierten Kenntnissen über photochemische Reaktionsmechanismen bietet die Anwendung einer einfachen Symbolik – wie Entkopplung von σ- und π-Bindungen und Rekombination der intermediär gebildeten Radikale – eine zweckmässige Grundlage zur Interpretation solcher Umwandlungen sowie zur Voraussage über deren möglichen Verlauf. Die Carbonylphotolyse einfacher



[46] S. WAWZONEK und T. P. CULBERTSON, J. Amer. chem. Soc. *81*, 3367 (1959).

[47] Als typische Reaktion dieser Art sei die Alkylierung von Cyclohexan mit Fluorenyl-Carben erwähnt: W. KRIMSE, L. HORNER und H. HOFFMANN, Liebigs Ann. *614*, 19 (1958).

[48] R. SCHIFF, Ber. dtsch. chem. Ges. *14*, 1375 (1881). Über die nach dem gleichen Reaktionsprinzip verlaufende Darstellung von Tricyclen und Nortricyclen berichten H. MEERWEIN und K. VAN EMSTER, Ber. dtsch. chem. Ges. *53*, 1815 (1920), bzw. K. ALDER, H. K. SCHÄFER, H. ESSER, H. KRIEGER und R. REUBKE, Liebigs Ann. *593*, 23 (1955).

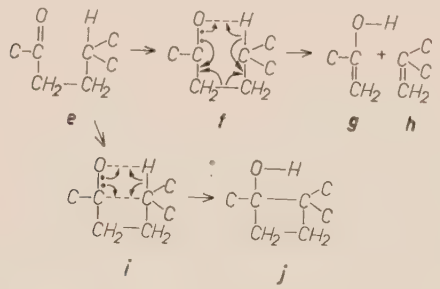
[49] Weitere intramolekulare Carbenreaktionen wurden auch von A. L. WILDS an einem Vortrag an der Universität Zürich am 4. Juni 1957 besprochen.

[50] Vgl. TH. CURTIUS und F. RAUTERBERG, J. prakt. Chem. *44*, 192 (1891).

[51] Vgl. O. SÜS *et al.*, Liebigs Ann. *556*, 65, 85 (1944); *579*, 133 (1953); *583*, 150 (1953); *593*, 91 (1955), über die Wolffsche Ketenumlagerung cyclischer Diazoketone.

[52] F. GREUTER, J. KALVODA und O. JEGER, Proc. chem. Soc. *1958*, 349.

Ketone und Aldehyde[53], die dank deren kontinuierlichen Absorption zwischen 230 und 330 mμ durch Lichteinwirkung in diesem Wellenbereich hervorgerufen wird und unter C–C-Spaltung zur Ausbildung von Acyl- und Alkyl-Radikalen führt, ist bereits eingehend untersucht worden. Bei der Photolyse höherer aliphatischer Carbonylverbindungen mit γ-ständigem Wasserstoffatom vom Typus **e** wurde erstmals von NORRISH[54] ein weiterer Fragmentierungsvorgang beobachtet. So kann bei solchen Ketonen und Aldehyden die Bindung zwischen den zur Carbonylgruppe α- und β-ständigen Kohlenstoffatomen gespalten werden unter Ausbildung der Enolform von Ketonen (vgl. **g**) und von Δ^1-Olefinen (vgl. **h**)[54]. Nach einem von DAVIS JR. und NOYES JR.[55] für diese bemerkenswerte Fragmentierung postulierten Quasi-Sechsring-Mechanismus wird die intramolekulare Reaktion durch das phototropisomere Diradikal **f**[56] eingeleitet. Intramolekulare Reaktionen von solchen zu Diradikalen entkoppelten Carbonylgruppen sind schon seit langem bekannt, wie zum Beispiel die lichtkatalysierte Addition von Aceton an verschiedene Alkohole[57]. In einer gleichzeitig mit unseren nachstehenden Arbeiten ausgeführten Untersuchung über das Verhalten aliphatischer Ketone unter Lichteinwirkung zeigte YANG[58,59], dass Aceton selbst an nicht aktivierte Kohlenwasserstoffe addiert werden kann. Bei der Bestrahlung von Methylketonen mit γ-ständigem Wasserstoffatom hingegen stellte er nebst der für solche Verbindungen typischen Fragmentierung zu Aceton und Δ^1-Olefinen auch die Ausbildung von 1-Methylcyclobutanol-Derivaten (vgl. **j**) fest. Ein solcher Ringschluss erfordert einen intramolekularen Angriff der zum Diradikal entkoppelten Ketogruppe am nicht aktivierten γ-ständigen Kohlenstoffatom, was wohl am besten durch den Übergangszustand **i** im Sinne einer 4-Zentren-Reaktion[60] illustriert werden kann.



Für die Wahl geeigneter Ausgangsprodukte zu einem lichtkatalysierten Angriff an der Methylgruppe 18 im starren Steroidgerüst war einmal mehr die räumlich vorteilhafte Lage der Stellung 20 der Pregnanseitenkette zu C-18 wegleitend. Die UV-Bestrahlung von 20-Ketopregnan-Verbindungen schien dabei am ehesten eine intramolekulare Reaktion zwischen der zu einem Diradikal vom Typus $>\dot{C}-\dot{O}$ angeregten 20-Ketogruppe und einer C–H-Bindung an C-18 zu begünstigen. Es wurden daher drei 20-Ketopregnan-Verbindungen, nämlich 3β-Acetoxy-20-keto-5α-pregnan (**58**), 3β-Acetoxy-20-keto-Δ^5-pregnen (**61**) und 3,3-Äthylendioxy-20-keto-Δ^5-pregnen (**64**)[61] mit ultraviolettem Licht bestrahlt[62,63]. In der Tat gelang es, in allen drei Versuchsreihen je zwei polare Alkohole zu isolieren, die alle mit den entsprechenden Ausgangssubstanzen isomer waren. Hauptsächlich auf Grund der Interpretation der IR-Absorptions- und Protonenresonanz-Spektren liess sich sämtlichen dieser neuen Verbindungen die allgemeine Struktur eines 20ξ-Hydroxy-18,20-cyclo-pregnans zuordnen (vgl. **59**, **60**, **62**, **63**, **65** und **66**). Durch geeignete Umwandlungen im Bereich der Ringe A und B konnten einerseits die Produkte **59**, **62** und **65** und anderseits **60**, **63** und **66** untereinander strukturell verknüpft werden. Daraus folgt, dass die Struktur der Ringe C, D und E der Verbindungen innerhalb dieser beiden Gruppen identisch sein muss. Der endgültige Beweis sowohl für die Konstitution wie Konfiguration der neuen Photoprodukte wurde durch eine Reihe chemischer Umsetzungen erbracht. Die Wasserabspaltung aus den Cyclisationsprodukten hatte dabei besonders grosse Aufmerksamkeit erfordert, bis es gelang, beim Alkohol **59** die Elimination mit Phosphoroxychlorid in Pyridin ohne Gerüstumlagerung zu bewerkstelligen. Erst durch die

[53] Vgl. W. DAVIS, JR., Chem. Rev. *40*, 201 (1947). – A. J. C. NICHOLSON, Rev. pure appl. Chem. *2*, 174 (1952). – E. W. R. STRACIE, *Atomic and Free Radical Reactions*, 2. Aufl. (Reinhold, New York 1954), p. 275, 318. – C. R. MASSON, V. BOEKELHEIDE und W. A. NOYES, JR., *Techniques of Organic Chemistry*, Vol. II (Interscience Publishers, New York 1956), p. 257. – T. W. MARTIN und J. N. PITTS, JR., J. Amer. chem. Soc. *77*, 5465 (1955). – P. P. MANNING, J. Amer. chem. Soc. *79*, 5151 (1957). – P. AUSLOOS, Canad. J. Chem. *36*, 400 (1958).

[54] R. G. W. NORRISH und M. E. S. APPLEYARD, J. chem. Soc. *1934*, 874. – R. G. W. NORRISH, Trans. Farad. Soc. *33*, 1521 (1937).

[55] W. DAVIS, JR. und W. A. NOYES, JR., J. Amer. chem. Soc. *69*, 2153 (1947). – Vgl. auch A. J. C. NICHOLSON, Trans. Farad. Soc. *50*, 1067 (1954). – J. R. MCNESBY and A. S. GORDON, J. Amer. chem. Soc. *80*, 261 (1958).

[56] Vgl. G. O. SCHENK, Angew. Chem. *69*, 579 (1957).

[57] G. CIAMICIAN und P. SILBER, Ber. dtsch. chem. Ges. *44*, 1280 (1911).

[58] N. C. YANG und D. D. H. YANG, J. Amer. chem. Soc. *80*, 2913 (1958).

[59] Vgl. auch M. BARNARD und N. C. YANG, Proc. chem. Soc. *1958*, 302. In dieser Arbeit wird beschrieben, wie unter Lichteinfluss die Ketogruppe in Cyclodecanon infolge günstiger räumlicher Lage mit einer nicht aktivierten Methylengruppe reagiert und unter transannularem Ringschluss zum tertiären Alkohol 9-Hydroxy-cis-decalin führt.

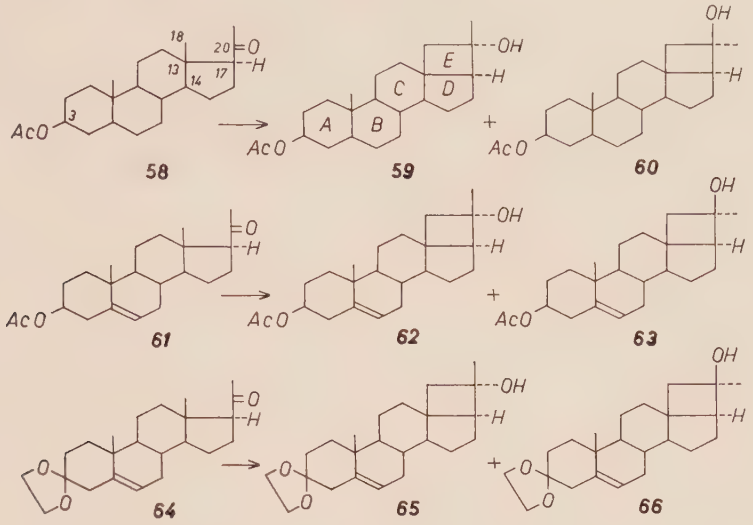
[60] Vgl. G. BÜCHI, J. T. KOFRAN, E. KOLLER und D. ROSENTHAL, J. Amer. chem. Soc. *78*, 876 (1956). – W. G. DAUBEN und G. J. FONKEN, J. Amer. chem. Soc. *81*, 4060 (1959). – W. G. DAUBEN, K. KOCH und W. E. THIESSEN, J. Amer. chem. Soc. *81*, 6087 (1959).

[61] A. ERCOLI und P. DE RUGGIERI, Gazz. chim. ital. *84*, 312 (1954).

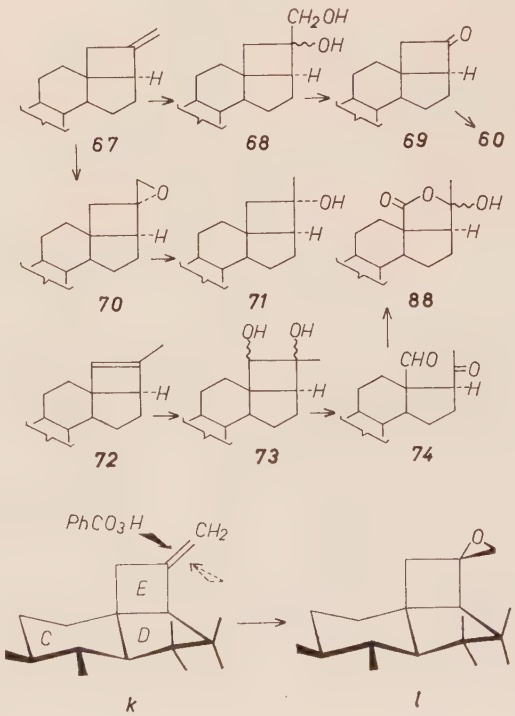
[62] P. BUCHSCHACHER, M. CERESHETTI, H. WEHRLI, K. SCHAFFNER und O. JEGER, Helv. chim. Acta *42*, 2122 (1959).

[63] M. CERESHETTI, H. WEHRLI, K. SCHAFFNER und O. JEGER, Helv. chim. Acta *43*, 354 (1960).

endocyclische Lage der Doppelbindung in einem Teil der resultierenden Anhydroprodukte (vgl. **72**) wurde in der Folge eine Überführung der 18,20-Cyclo-pregnan-Verbindungen in 18-oxygenierte Steroide ermöglicht.



Behandlung des Alkohols **59** mit Phosphoroxychlorid führte nämlich zu den zwei isomeren Wasserabspaltungsprodukten **67** und **72**. Das Methylen-cyclobutan-Derivat **67** wurde mit Osmium(VIII)-oxyd zum α-Glykol **68** hydroxyliert und dieses mit Perjodsäure zum Norketon **69** gespalten. Diese Reaktionsfolge, einschliesslich der für Vierring-Ketone charakteristischen IR-Absorptionsbande von **69**, bestätigte das Vorliegen eines tertiären Methyl-cyclobutanol-Systems in **59** und damit auch in **62** und **65**. Wurde anderseits das aus dem isomeren Wasserabspaltungsprodukt **72** erhältliche Diol **73** oxydativ gespalten, resultierte die 18,20-Dioxo-Verbindung **74**, die sich ihrerseits durch weitere Oxydation in die bereits bekannte Pseudosäure **88**[64] umwandeln liess. Aus dieser Überführung wurde als wichtigste Folgerung ersichtlich, dass die Konfiguration der asymmetrischen Kohlenstoffatome 13 und 17 im Photoprodukt **59** und damit auch in den mit **59** verknüpften Alkoholen **62** und **65** unverändert erhalten worden ist. Es konnte nun versucht werden, in den beiden Verbindungen **67** und **69** die tertiäre Hydroxylgruppe in Stellung 20 stereospezifisch unter Ausnützung der besonderen räumlichen Verhältnisse wieder einzuführen. Bei der Behandlung des Wasserabspaltungsproduktes **67** mit Benzoepersäure wurde ein Epoxyd erhalten, dem in der Annahme, dass sich das Reagens der exocyclischen Methylengruppe von der gut zugänglichen konvexen Seite des [0,2,3]-Bicycloheptan-Systems der Ringe D und E nähert (vgl. Partialformeln **k** und **l**), die Raumformel **70** zugeschrieben wurde. Die reduktive Spaltung des Epoxyds **70** mit Lithiumaluminiumhydrid ergab die (20*S*)-Dihydroxy-Verbindung **71**[65], welche mit dem aus dem Photoprodukt **59** durch alkalische Hydrolyse anfallenden Derivat identisch war. Der Alkohol mit umgekehrter Konfiguration an C-20 war infolge der gleichen sterischen Faktoren mittels Grignard-Reaktion des Norketons **69** mit Methylmagnesiumjodid zugänglich und erwies sich als identisch mit dem zweiten Photoprodukt **60** aus 3β-Acetoxy-20-keto-5α-pregnan (**58**). Da die restlichen vier Cyclisationsprodukte (**62, 63, 65** und **66**) bereits mit **59** und **60** verknüpft worden waren, beschlossen diese beiden Resultate die vollständige Aufklärung der beschriebenen, durch photochemischen Ringschluss zwischen C-18 und C-20 entstandenen Verbindungen.

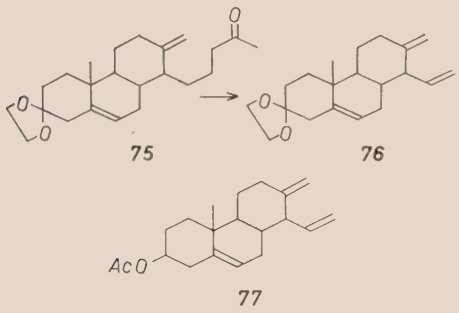


[64] G. CAINELLI, M. LJ. MIHAILOVIĆ, D. ARIGONI und O. JEGER, Helv. chim. Acta *42*, 1126 (1959).

[65] Zur konfigurativen Bezeichnung des asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatoms 20 von Pregnan-Verbindungen vgl. die Diskussion bei B. KAMBER *et al.*[72]

Die Belichtungsreaktionen wurden sowohl in Äthanol- wie in *n*-Hexan-Lösungen untersucht. Die Verwendung von *n*-Hexan als Lösungsmittel führt hauptsächlich zu den (20*S*)-Hydroxy-Derivaten, während die stereoisomeren (20*R*)-Alkohole in nur minimalen Mengen anfallen. In Äthanol hingegen ist die Ausbeute an beiden Produkten merklich höher. Der Verlauf der photochemischen Cyclisation scheint jedoch sowohl in quantitativer wie in stereochemischer Hinsicht nicht nur von der Wahl des Lösungsmittels bestimmt zu werden, sondern auch von den Substituenten des Pregnangerüstes abzuhängen. Namentlich bei der Bildung des (20*R*)-Alkohols in Äthanol treten wesentliche quantitative Unterschiede auf zwischen den Edukten 3β-Acetoxy-20-keto-5α-pregnan (**58**) einerseits und 3β-Acetoxy-20-keto-Δ^5-pregnen (**61**) und 3,3-Äthylendioxy-20-keto-Δ^5-pregnen (**64**) anderseits.

Aus den Reaktionsgemischen der Belichtung von 3β-Acetoxy-20-keto-Δ^5-pregnen (**61**) und von 3,3-Äthylendioxy-20-keto-Δ^5-pregnen (**64**) gelang es überdies, noch ein bzw. zwei weitere, unpolare Produkte kristallin zu fassen. So lieferte das Ausgangsprodukt **64** das bereits anderweitig beschriebene 13,17-Secoketon **75** [66], welches bei verlängerter Belichtung eine abermalige Fragmentierung erleidet unter Bildung des tricyclischen Produktes **76**. Unter den Photoprodukten von **61** fand sich schliesslich die zu **76** analoge Verbindung **77**.

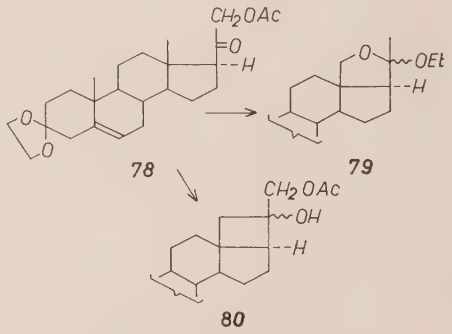


Diese Resultate ermöglichen gesamthaft bereits einen genaueren Einblick in das photochemische Verhalten von 20-Keto-pregnanen. Der präparativ bedeutsame Ringschluss zwischen C-18 und C-20 zu zwei stereoisomeren Vierring-Derivaten wird offensichtlich einmal mehr durch die zum Diradikal entkoppelte Ketogruppe in Form einer 4-Zentren-Reaktion eingeleitet (vgl. dazu den Cyclisations-Mechanismus **e**→**i**→**j**[58, 60]). Auf die als Konkurrenzreaktionen auftretenden Fragmentierungen, die zu 13,17-Seco-Verbindungen (vgl. **75**) und in einer weiteren Zerfallsstufe zu tricyclischen Produkten (vgl. **76** und **77**) führen, lässt sich der von DAVIS JR. und NOYES JR.[55] vorgeschlagene Quasi-Sechsring-Mechanismus (vgl. den Übergangszustand **f**) übertragen. Solche Fragmentierungen eröffnen eine denkbar einfache Möglichkeit, in einem einzigen übersichtlichen Schritt polycyclische Verbindungen zu wesentlich einfacheren Molekülen abzubauen – eine Aufgabe, die sonst bei der Konstitutionsaufklärung oft nur in mühsamen, mehrstufigen Reaktionsfolgen verwirklicht werden kann.

Belichtungsversuche an einer Reihe von 20-Keto-pregnan-Derivaten mit verschiedenartigen Sauerstoff-Funktionen in Stellung 11[13] ergaben, dass der photochemische Ringschluss zwischen C-18 und C-20 auch in solchen Fällen in teils ebenso guter Ausbeute durchgeführt werden kann.

In systematischer Erweiterung unserer Untersuchungen wurde als nächstes mit dem Cortexon-Derivat **78** eine 20-Keto-pregnan-Verbindung mit einem 21-Acyloxy-Substituenten bestrahlt[67]. Es gelang dabei überraschenderweise, ein Produkt zu isolieren, welches nach Behandlung mit Säure das in seiner Halbacetal-Form **15** vorliegende 18-Hydroxy-progesteron[20, 21] lieferte. Zusammen mit den spektral- und mikroanalytischen Daten ist diese Umwandlung für die Konstitution **79** des neuen Photoproduktes beweisend. Wie erwartet, tritt parallel zu der neuartigen Reaktion auch eine Cyclisation zur pentacarbocyclischen Verbindung **80** auf.

Die lichtinduzierte Umwandlung des 20-Keto-21-acetoxy-pregnans **78** in die Verbindung **79** stellt eine intramolekulare Reaktion zur direkten Substitution von C-18 mit einer Sauerstoff-Funktion dar. Der Vorgang repräsentiert ausserdem einen weiteren Fragmentierungsmodus, indem die Bindung zwischen einem Kohlenstoff- und einem Sauerstoffatom gespalten wird. Früheren Beispielen[62, 63] analoge C–C-Fragmentierungen konnten hingegen hier nur in wesentlich kleinerem Ausmass festgestellt werden. Den Anlass zu dieser zusätzlichen Reaktionsmöglichkeit der photochemisch angeregten 20-Keto-gruppe gibt offensichtlich der Acyloxy-Substituent an C-21. Als möglicher Mechanismus erscheint dabei hauptsächlich der Radikalvorgang, der zu einem Enoläther des Typus **n** als Zwischenprodukt

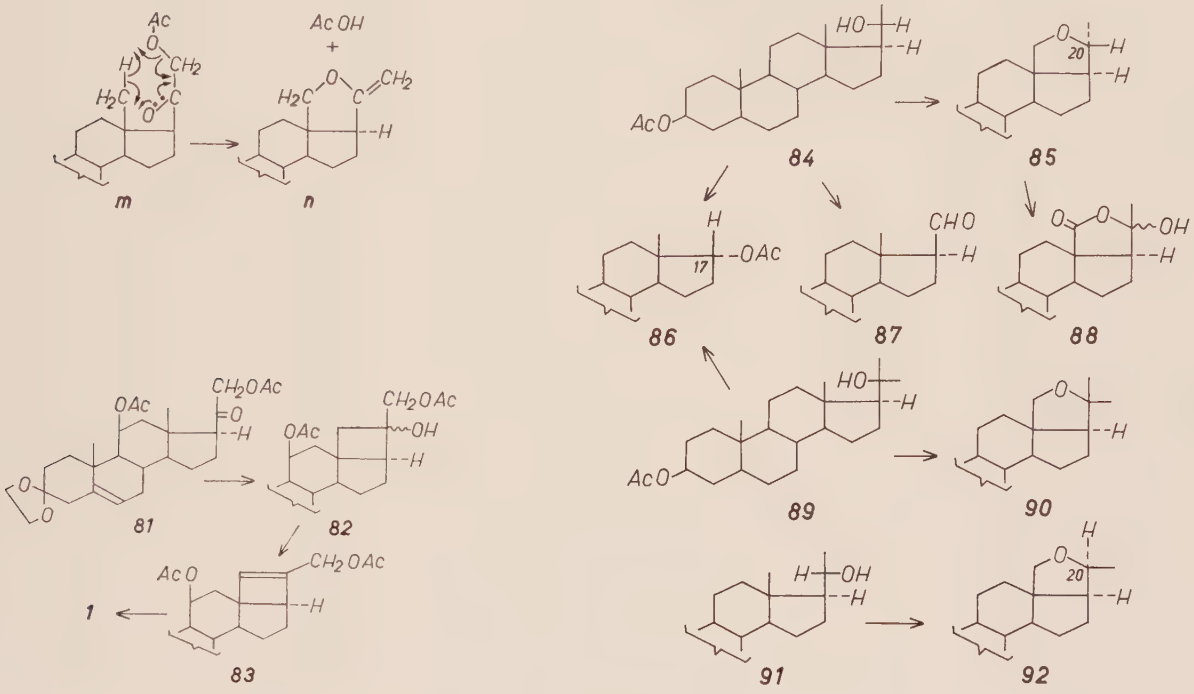


[66] R. ANLIKER, M. MÜLLER, M. PERELMAN, J. WOHLFAHRT und H. HEUSSER, Helv. chim. Acta *42*, 1071 (1959).

[67] H. WEHRLI, M. CEREGHETTI, K. SCHAFFNER und O. JEGER, Helv. chim. Acta *43*, 367 (1960).

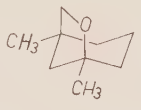
führt, besonders attraktiv (vgl. **m** → **n**). Der letzte Schritt zur Ausbildung der Verbindung **79** würde dann lediglich noch in der photochemischen Anlagerung von Äthanol an die 20,21-Doppelbindung bestehen.

Durch Übertragung dieser anhand von Modellversuchen ausgearbeiteten Reaktionen auf das 3,3-Äthylenketal-11,21-diacetat des Corticosterons (**81**) liegt eine im wesentlichen dreistufige Partialsynthese des *nat.*-Aldosterons (**1**) im Bereich der Möglichkeiten (vgl. **81** → **82** → **83** → **1**). Solche auf photochemischen Reaktionen basierenden Synthesen können allerdings nur dann Bedeutung erlangen, wenn genügend leistungsfähige Strahlungsquellen mit den erforderlichen Emissionsbanden gefunden werden können.



Die Entdeckung einer zweiten, präparativ weitaus ergiebigeren Methode zur direkten Sauerstoffeinführung in die Methylgruppe 18 fusst auf der Beobachtung von MIHAILOVIĆ, dass die Oxydation einwertiger aliphatischer Alkohole mit Blei(IV)-acetat zu sauerstoffhaltigen Produkten führt, die weder Carbonyl- noch Hydroxyl-Funktionen aufweisen[68]. Auf Grund dieser Feststellungen war es naheliegend, eine Ätherbildung zu vermuten und im Rahmen unserer Untersuchungen, die sich mit selektiven Angriffsreaktionen an C-18 des Steroidgerüstes befassten, eine analoge Oxydation auf einen geeigneten 20-Pregnan-Alkohol zu übertragen. Tatsächlich ergab die Behandlung von (20*R*)-3β-Acetoxy-20-hydroxy-5α-pregnan (**84**)[69] als Hauptprodukt das (20*R*)-18,20-Oxido-Steroid **85**[64,65]. Die Struktur desselben konnte dadurch bewiesen werden, dass **85** durch Behandlung mit Chrom(VI)-oxyd in die Pseudosäure **88** übergeführt wurde. Als Nebenprodukte der Oxydation von **84** mit Blei(IV)-acetat konnten unter anderen die Verbindungen **86** und **87** isoliert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Übertragung der gleichen Reaktion auf das höhere Homologe **89** mit tertiärer Hydroxylgruppe an C-20, welches nebst dem zu erwartenden 18,20-Oxido-Derivat **90** erhebliche Mengen des 17α-Acetats **86** lieferte. Eine Fragmentierung des Moleküls unterblieb dagegen im Wesentlichen bei den bisher untersuchten (20*S*)-Hydroxypregnan-Derivaten vom Typus **91**, die unter gleichen Reaktionsbedingungen in ausgezeichneter Ausbeute die entsprechenden Äther der Struktur **92** liefern.

Dieser Äther-Ringschluss (**84** → **85**) erinnert an die Cyclisation zum bicyclischen Äther **93**, die COREY und WHITE[70] durch Einwirkung von *p*-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid auf 1,3,3-Trimethyl-cyclohexyl-hydroperoxyd-(1) glückte.



[68] Privatmitteilung von Dr. M. Lj. MIHAILOVIĆ.

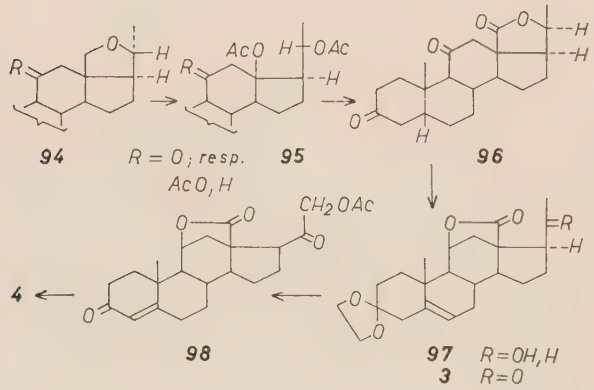
[69] W. KLYNE und D. H. R. BARTON, J. Amer. chem. Soc. *71*, 1500 (1949).

[70] E. J. COREY und R. W. WHITE, J. Amer. chem. Soc. *80*, 6686 (1958).

Hinsichtlich des Mechanismus der Ätherbildung mittels Blei(IV)-acetat-Oxydation darf zufolge früherer Arbeiten[71] angenommen werden, dass als erster Schritt die Ausbildung eines Alkoxy-Derivates des vierwertigen Bleis erfolgt. Die Entscheidung, ob dem Zerfall desselben ionische oder radikalische Natur zukommt, ist mangels genügender Anhaltspunkte wohl noch verfrüht.

4. *Partialsynthese des nat.-Aldosterons*

Gestützt auf den mittels Blei(IV)-acetat-Einwirkung erzielten Äther-Ringschluss sowie auf die Ausarbeitung verschiedener Methoden zur präparativen Öffnung des Äthers **85**[72] konnte schliesslich in enger Zusammenarbeit mit der unter der Leitung von WETTSTEIN und ANNER stehenden Forschungsgruppe der CIBA erstmals eine Partialsynthese des *nat.*-Aldosterons verwirklicht werden[73]. Diese stellte im Vergleich zu den bekannten Totalsynthesen hinsichtlich Ausbeute und Anzahl der Reaktionsstufen eine höchst bedeutsame Verbesserung dar. Als Ausgangsmaterial gelangten 11-oxygenierte Steroide zur Anwendung, die sowohl aus Gallensäuren wie aus pflanzlichen Sapogeninen und Sterinen leicht zugänglich sind. Durch Überführung dieser Produkte in 18,20-Oxido-Derivate (vgl. Partialformel **94**) und Spaltung des Ätherrings mit Bortrifluorid-Ätherat in Acetanhydrid wurden die entsprechenden (20*S*)-18,20-Diacetoxy-Verbindungen vom Typus **95** hergestellt, die nach Verseifung und Oxydation als gemeinsames Hauptprodukt das Lacton **96** lieferten.



Der üblichen Einführung der Δ^5-3,3-Äthylendioxy-Gruppierung in den Ringen A und B folgte die Reduktion der 11-Ketogruppe unter simultaner Umlactonisierung zum 20-Hydroxy-lacton **97**, das sich seinerseits zur *nat.*-Form des bereits früher[5] totalsynthetisch gewonnenen Racemats **3** oxydieren liess. Der Einbau des Acetatrestes in C-21 erfolgte nach beschriebenen Methoden und führte zum optisch aktiven Acetoxy-keton **98**, das bekanntlich durch Spaltung seines Racemats bereits isoliert und zum Ketol **4**[5,6] hydrolisiert worden war[8,74].

5. *Schlussbetrachtungen*

An den in Abschnitt 3 besprochenen Beispielen wurde eindrücklich demonstriert, wie durch konstellativ günstige Fixierung der Reaktionszentren zueinander ein sonst kaum durchführbarer selektiver Angriff an nicht aktivierten Kohlenstoffatomen überraschend leicht herbeigeführt werden kann. Es ist zweifellos zu erwarten, dass unter Ausnützung der gleichen Prinzipien und unter Zuziehung neuer, leistungsfähigerer Reagenzien weitere Reaktionen desselben Typus gefunden werden können. Die Auswertung solcher neuartiger Umsetzungen für synthetische Aufgaben, insbesondere auf dem Gebiet der Naturstoffchemie, dürfte verlockende Möglichkeiten eröffnen.

Die erreichten Resultate gestatten, das gestellte Problem in der Weise zu lösen, dass durch die direkte Oxygenierung der angulären Methylgruppe 18 des Steroidgerüstes die erste ergiebige Partialsynthese von *nat.*-Aldosteron ausgeführt werden konnte.

Abschliessend möchten wir der Meinung Ausdruck geben, dass eine weitere Entwicklungsmöglichkeit dieser an Hand *intramolekularer* Reaktionen erprobten Substitutionsmethoden dahin zielen dürfte, nach analogen *intermolekularen* Umsetzungen mit ebenso selektiver Wirkung zu suchen. Damit würden sich endlich lang gesuchte *chemische Modelle für enzymatische Reaktionen* ergeben.

Summary

The problem of an efficient partial synthesis of the important corticosteroidal hormone, aldosterone, involves the ability to obtain steroids with functional groups at C–18. Thus, naturally occuring steroid alkaloids, holarrhimine and conessine, were degraded to nitrogen-free 18-hydroxysteroids.

In order to find other more efficient methods of synthesis, attempts were made to effect direct functionalization of the unactivated angular methyl group 18 in steroids. This was achieved by known and by novel intramolecular substitution procedures.

In the course of these investigations, conessin-type compounds, novel pentacarbocyclic steroids with four- and five-membered E ring as well as novel 18,20-oxido steroids were synthesized from pregnane derivatives. The lead tetraacetate oxidation of 20-hydroxypregnanes, leading to ether formation between C–18 and C–20, ultimately provided the key step for the first partial synthesis of *nat.*-aldosterone. The latter work was carried out in close collaboration with the research group of the Pharmaceutical Department of CIBA Ltd., Basle.

[71] R. CRIEGEE, L. KRAFT und B. RANK, Liebigs Ann. *507*, 159 (1933).
[72] B. KAMBER, G. CAINELLI, D. ARIGONI und O. JEGER, Helv. chim. Acta *43*, 347 (1960).
[73] K. HEUSLER, J. KALVODA, CH. MEYSTRE, P. WIELAND, G. ANNER, A. WETTSTEIN, G. CAINELLI, D. ARIGONI und O. JEGER, Exper. *16*, 21 (1960).
[74] *Zusatz bei der Korrektur:* Gestützt auf unsere Veröffentlichung[64], haben inzwischen L. VELLUZ, G. MULLER, R. BARDONESCHI und A. POITTEVIN, Comptes rendus *250*, 725 (1960), eine analoge Partialsynthese des *nat.*-Aldosterons verwirklicht.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents

1,4-Carbonyl-Carbonyl Interactions

It is well known that natural (20-normal) steroids containing a carbonyl group at the 22-position can be isomerized to the 20-iso compounds, usually to the greater part. This is true for 22-carbonyl steroids unsubstituted at C-16 as well as for such compounds bearing a 16α-acetoxy or a 16-cycloethylenedioxy grouping (for leading references, see [1]).

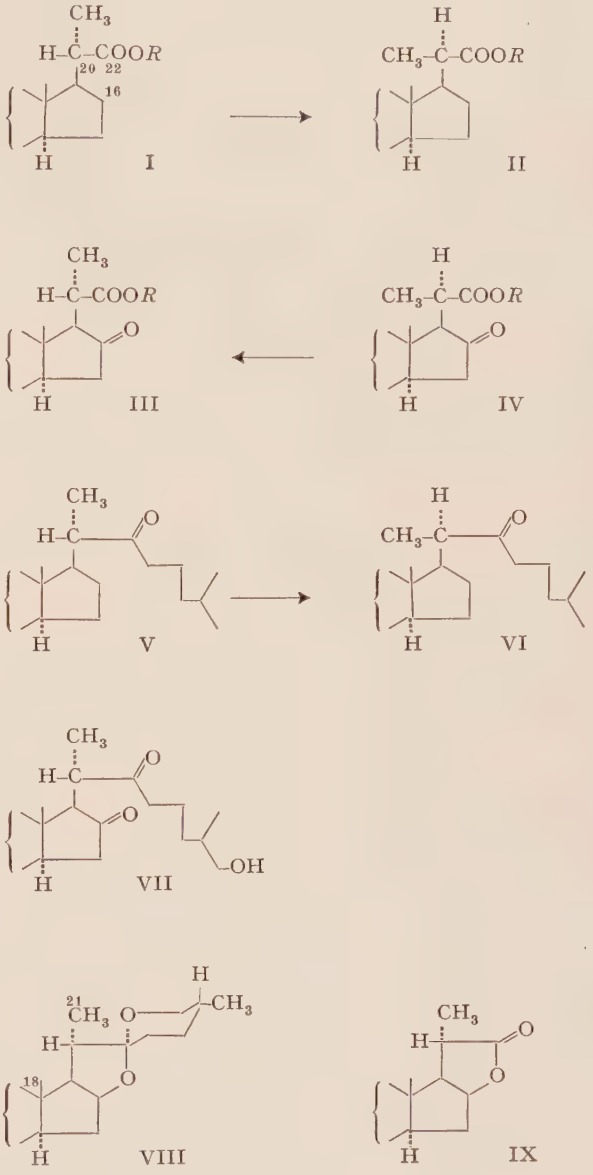
We have recently remarked[1] on the surprising fact that when an additional keto group is introduced at C-16 into a 22-carbonyl steroid, the stability relationship is reversed and the 20-normal configuration becomes the more stable. Thus, whereas esters of 16-unsubstituted bisnorcholanic acids (type I) can be inverted with base to the 20-iso compounds (II)[2,3], the 16-keto ester, methyl 3,16-diketobisnorcholanate (III), cannot be inverted and in fact is obtained quantitatively from the 20-iso ester IV by treatment with base and re-esterification[1]. Similarly, whereas 22-ketocholesterol (V) can be inverted to the 20-iso epimer VI[4], 16,22-diketo-27-hydroxycholesterol (kryptogenin) (VII) appears to possess the stable configuration at C-20[1].

In the case where the 20-position forms part of a ring, as in the steroidal sapogenins of type VIII or in the derived lactones IX, the natural 21α-methyl configuration (as shown) is the stable one. This is in keeping with expectation, since the 21-methyl group is fixed in space in these substances and there is considerable interference between the 18β- and 21β-methyl groups in the corresponding unnatural 20-iso compounds[3].

A likely explanation for the observed stability of the 16,22-dicarbonyl compounds III and VII appeared to us to involve the existence of an intramolecular field effect between the two carbonyl dipoles in these compounds, which would favour the carbonyl groups being close to each other. In this spatial arrangement, interference between the 21- and 18β-methyl groups would occur in the 20-iso but not in the 20-normal (21α-methyl) series, the situation paralleling that which exists in the cyclic systems VIII and IX.

We have now found indications that this type of field effect is in fact operative, by a study of the infrared spectra. These show that interaction between the 16- and 22-carbonyl groups in compounds of type III and VII does occur, as indicated by the raising of the carbonyl frequencies compared with the normal values.

In Table I are recorded the infrared carbonyl bands in the 1700 cm^{-1} region of a number of steroidal 22-monoketones (X–XIV). All of these compounds, whether substituted at C_{16} or at C_{27}, absorb at 1704 (± 2) cm^{-1}, the normal value[5]. In Table II, the corresponding infrared bands of several 16,22-diketones (XV–XX) are listed. It can be seen that all of these substances show two bands. The one at 1731 (± 1) cm^{-1}, due to the 16-keto group, is normal for an α-substituted cyclopentanone, α-methylcyclopentanone (XXII) showing the ketone band at 1730 cm^{-1} (Table III). However, the other band at 1714 (± 2) cm^{-1}, due to the 22-carbonyl group, has been displaced upwards by ca. 10 cm^{-1} compared with the values for the 22-monoketones listed in Table I[6]. This effect clearly demonstrates that an interaction between the two carbonyl groups is operative.



[1] N. Danieli, Y. Mazur, and F. Sondheimer, Chem. & Ind. *1958*, 1725.

[2] H. Wieland, O. Schlichting, and R. Jacobi, Z. physiol. Chem. *161*, 80 (1926). – M. Sorkin and T. Reichstein, Helv. chim. Acta *27*, 1631 (1944); *28*, 875 (1945).

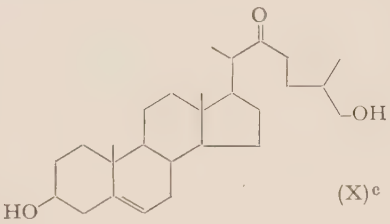
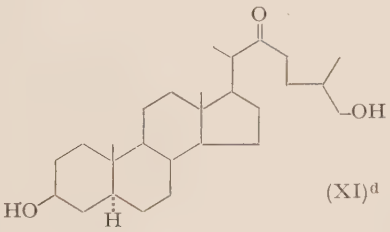
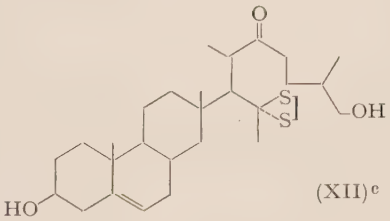
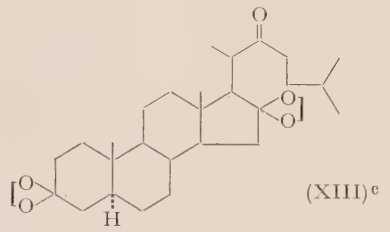
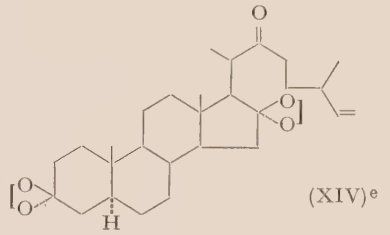
[3] J. W. Corcoran and H. Hirschmann, J. Amer. chem. Soc. *78*, 2325 (1956) and references to earlier work cited there.

[4] R. Hayatsu, Pharm. Bull. (Japan) *5*, 452 (1957).

[5] R. N. Jones and F. Herling, J. org. Chem. *19*, 1252 (1954).

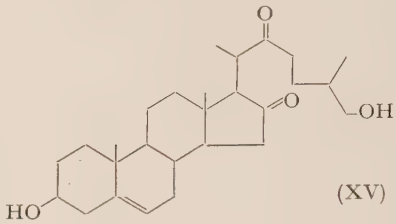
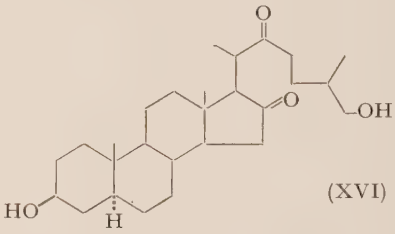
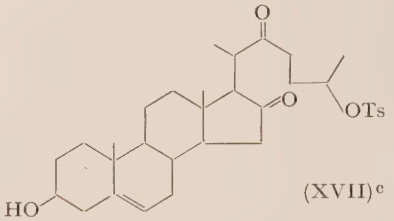
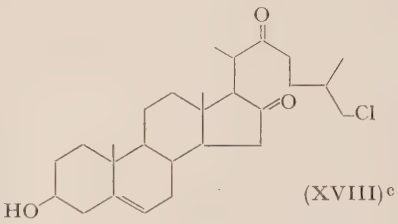
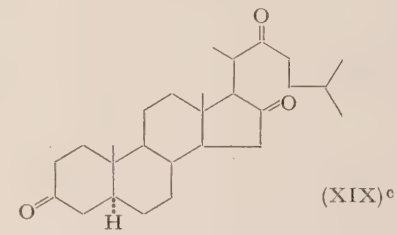
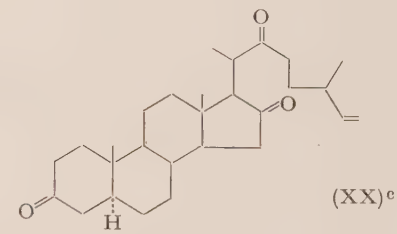
[6] In the compounds (XIX) and (XX) in Table II, the band at 1716 cm^{-1} is due both to the 22- and to the 3-carbonyl group. Since the normal values for these individual functions are 1704 cm^{-1} (Table I) and ca. 1708 cm^{-1}, the observed values have also been displaced upwards by ca. 10 cm^{-1}.

Table I

Compound [a]	$\nu_{max}(CHCl_3)$ [b]
 (X)[c]	1703 cm^{-1}
 (XI)[d]	1706 cm^{-1}[d]
 (XII)[c]	1703 cm^{-1}
 (XIII)[c]	1705 cm^{-1}
 (XIV)[e]	1705 cm^{-1}

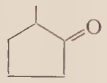
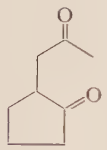
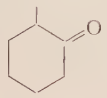
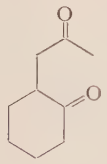
[a] All compounds possess the natural configuration at C-20.
[b] All values determined by ourselves, except where stated otherwise.
[c] Prepared in these Laboratories.
[d] I. Scheer, M. J. Thompson, and E. Mosettig, J. Amer. chem. Soc. *79*, 3218 (1957).
[e] Y. Mazur and F. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. *81*, 3161 (1959).

Table II

Compound [a]	$\nu_{max}(CHCl_3)$ [b]
 (XV)	1714, 1732 cm^{-1}
 (XVI)	1714, 1731 cm^{-1}
 (XVII)[c]	1715, 1732 cm^{-1}
 (XVIII)[c]	1713, 1732 cm^{-1}
 (XIX)[c]	1716, 1730 cm^{-1}
 (XX)[c]	1716, 1730 cm^{-1}

[a] All compounds possess the natural configuration at C-20.
[b] All values determined by ourselves.
[c] Prepared in these Laboratories.

Table III

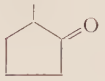
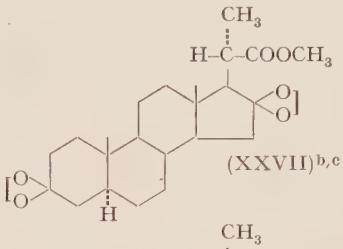
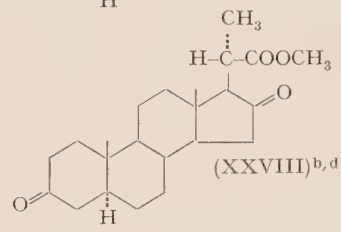
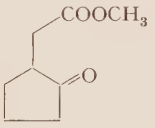
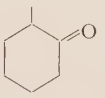
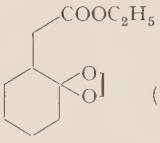
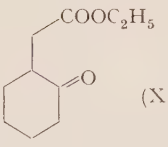
Compound		$\nu_{max}(CHCl_3)$ [a]
CH_3COCH_3	(XXI)	1712 cm^{-1}
	(XXII)	1730 cm^{-1}
	(XXIII)[b]	1721, 1731 cm^{-1}
	(XXIV)	1703 cm^{-1}
	(XXV)[c]	1708 cm^{-1}
$CH_3COCH_2CH_2COCH_3$	(XXVI)	1712 cm^{-1}

[a] All values determined by ourselves.
[b] H. Paul and I. Wendel, Chem. Ber. *90*, 1342 (1957).
[c] H. E. Baumgarten, P. L. Creger, and C. E. Villars, J. Amer. chem. Soc. *80*, 6609 (1958).

This type of interaction between the keto groups in 1,4-diketones is not restricted to steroids, as appears from the data presented in Table III. Thus, α-acetonylcyclopentanone (XXIII) (which contains the same type of system as the 16,22-diketo steroids) exhibits the cyclopentanone band at the normal position at 1731 cm^{-1} [compared with 1730 cm^{-1} for α-methylcyclopentanone (XXII)], but the alicyclic carbonyl band at 1721 cm^{-1} has been displaced upwards by ca. 9 cm^{-1} compared with an ordinary acyclic ketone such as acetone (XXI) (1712 cm^{-1}). On the other hand, the corresponding six-membered ring analog α-acetonylcyclohexanone (XXV) and the acyclic analog acetonylacetone (XXVI) both show carbonyl bands at normal positions.

The postulated type of 1,4-carbonyl-carbonyl interaction is operative also with 1,4-keto-esters, as is aparent from an examination of their infrared spectra (though not as markedly as with the 1,4-diketones). It can be seen from the data in Table IV that in methyl 3,16-diketobisnorcholanate (XXVIII) the superimposed ester and 16-keto band at 1734 cm^{-1} is ca. 5 cm^{-1} higher than would be expected from the superposition of the ester band in the corresponding dicycloethylene ketal (XXVII) (1727 cm^{-1}) and the ketone band in α-methylcyclopentanone (XXII) (1730 cm^{-1}). Again the effect is not restricted to steroids and, in the analogous ethyl α-cyclopentanone-acetate (XXX), the superposed ester and cyclopentanone band at 1733 cm^{-1} is ca. 5 cm^{-1} higher than would be expected from the superposition of the bands of the individual functions (1726 and 1730 cm^{-1}). On the other

Table IV

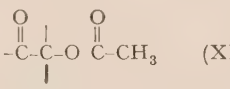
Compound		$\nu_{max}(CHCl_3)$ [a]
	(XXII)	1730 cm^{-1}
	(XXVII)[b,c]	1727 cm^{-1}
	(XXVIII)[b,d]	1710, 1734 cm^{-1}
$CH_3COOC_2H_5$	(XXIX)	1726 cm^{-1}
	(XXX)[e]	1733 cm^{-1}
	(XXIV)	1703 cm^{-1}
	(XXXI)[f]	1725 cm^{-1}
	(XXXII)[g]	1704, 1724 cm^{-1}
$CH_3COCH_2CH_2COOC_2H_5$	(XXXIII)	1712, 1726 cm^{-1}

[a] All values determined by ourselves.
[b] J. W. Corcoran and H. Hirschmann, J. Amer. chem. Soc. *78*, 2325 (1956).
[c] Y. Mazur and F. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. *81*, 3161 (1959).
[d] N. Danieli, Y. Mazur, and F. Sondheimer, Chem. & Ind. 1725, (1958).
[e] *Cf.* A. Kötz, Liebigs Ann. *350*, 238 (1906).
[f] Prepared in these Laboratories.
[g] Kindly presented by Dr. A. Meisels.

hand, the corresponding six-membered ring analog (XXXII) and the acyclic analog ethyl levulinate (XXXIII) show carbonyl bands at normal positions.

It therefore appears that the interaction between the carbonyl groups both in 1,4-diketones and in 1,4-keto-esters occurs only when one ketone is in a five-membered ring, presumably because the latter renders the system more rigid.

The presently described carbonyl-carbonyl interactions in 1,4-dicarbonyl compounds are probably of the same type as exist in α-acetoxy-ketones of type (XXXIV), which may also be considered as 1,4-dicarbonyl systems. Thus, in 21-acetoxy-20-keto-steroids the ketone band as well as the ester band is raised by ca. 20 cm^{-1} over the normal values[5,7,8] while in 17α- and 17β-acetoxy-20-keto-steroids the ketone band is raised by ca. 8 cm^{-1} (the acetate band being essentially unaffected)[8,9]. Similar effects have been found in steroidal 12-acetoxy-11-ones and 11-acetoxy-12-ones[10].



(XXXIV)

It has already been postulated by Jones *et al.*[8,11] that the anomalous infrared spectra of these α-acetoxy-ketones are due to the existence of a field effect between the two carbonyl groups and Bellamy and Williams[12] have provided evidence for this by pointing out that the anomaly is markedly dependant on steric factors. The steric nature of this effect is also shown well by our finding (Table V) that whereas the expected raising of the infrared carbonyl bands occurs with acetol acetate (XXXVI) (+ 21 cm^{-1} for the ketone band; + 21 cm^{-1} for the ester band) it is considerably less marked in acetol pivalate (+ 11 cm^{-1} and 18 cm^{-1}, respectively) in which the extra methyl groups prevent the carbonyl dipoles from being as close to each other as in the acetate.

Table V

Compound	$\nu_{max}(CHCl_3)$[a]
CH_3COCH_3 (XXI)	1712 cm^{-1}
$CH_3COOC_2H_5$ (XXIX)	1726 cm^{-1}
$(CH_3)_3COOCH_3$ (XXXV)	1718 cm^{-1}
$CH_3COCH_2OCOCH_3$ (XXXVI)[b] . .	1733, 1747 cm^{-1}
$CH_3COCH_2OCOC(CH_3)_3$ (XXXVII)[b]	1723, 1736 cm^{-1}

[a] All values determined by ourselves.

[b] Prepared in these Laboratories by reaction of α-chloro-acetone with the corresponding potassium alkoxide.

All the infrared data discussed clearly point to the existence of an intramolecular field effect between the carbonyl groups in certain 1,4-dicarbonyl compounds. Although the exact nature of this effect is still not well understood, it must operate between the dipoles across space and is clearly different in nature from inductive and mesomeric effects which are transmitted through the chain.

We thank Dr. S. Pinchas, Weizmann Institute of Science, who determined most of the infrared spectra on a Perkin-Elmer model 12 C single-beam spectrophotometer (sodium chloride optics).

Y. Mazur* and F. Sondheimer

Daniel Sieff Research Institute, Weizmann Institute of Science, Rehovoth (Israel), January 5, 1960.

Zusammenfassung

Es wird gezeigt, dass die IR-Spektren gewisser 1,4-Diketone und 1,4-Ketoester abnorm hohe Carbonylfrequenzen aufweisen, was auf das Vorhandensein eines intramolekularen Feldeffekts zwischen den beiden Carbonylgruppen in diesen Verbindungen hindeutet. Die ungewöhnlichen Stabilitätsverhältnisse an C-20 der 16,22-Dicarbonyl-Steroide sind vermutlich auf die gleiche 1,4-Carbonyl-Carbonyl-Einwirkung zurückzuführen.

* At present Fellow of the School for Advanced Studies, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., U.S.A.

[7] R. N. Jones, P. Humphries, and K. Dobriner, J. Amer. chem. Soc. *72*, 956 (1950).

[8] R. N. Jones, P. Humphries, F. Herling, and K. Dobriner, J. Amer. chem Soc. *74*, 2820 (1952).

[9] R. B. Turner, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3489 (1953).

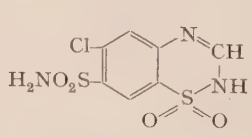
[10] J. Elks, G. H. Phillips, T. Walker, and L. J. Wyman, J. chem. Soc. *1956*, 4330.

[11] R. N. Jones and C. Sandorfy, *Chemical Applications of Spectroscopy* (Interscience, New York 1956).

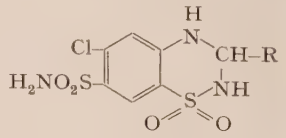
[12] L. J. Bellamy and R. L. Williams, J. chem. Soc. *1957*, 861.

3-Haloalkyl-Dihydrobenzothiadiazine Dioxides as Potent Diuretic Agents

The class of compounds based on the 1,2,4-benzothiadiazine nucleus became important from the standpoint of pharmacological activity with the discovery that 6-chloro-7-sulfamyl-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide (I) was a potent, orally effective diuretic agent of low toxicity[1].



(I)



(II)

As part of a program directed towards structural modifications of I, with the view of finding other agents of increased activity along with superior electrolyte excretion patterns, we have prepared a series of compounds

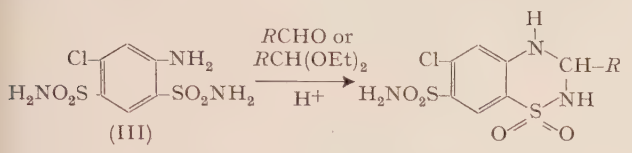
[1] F. C. Novello and J. M. Sprague, J. Amer. chem. Soc. *79*, 2028 (1957). The generic name of this compound is chlorothiazide.

[2] G. De Stevens, L. H. Werner, A. Halamandaris, and S. Ricca Jr., Exper. *14*, 463 (1958). The generic name of this compound is hydrochlorothiazide.

[3] Hahnemann Medical College and Hospital, *Symposium on Edema*, Philadelphia, Pa., December 7 to 11 (1959).

represented by formula II. While this work was in progress, De Stevens *et al.* described the synthesis and diuretic activity of 6-chloro-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide, II (R = H)[2]. From our own findings and those reported by De Stevens *et al.*, it was apparent that hydrogenation of the 3,4 double bond in I resulted in a compound with at least a ten fold increase in potency together with a somewhat improved electrolyte excretion pattern. With variation in R this relationship seemed to hold for most cases.

Compounds of type II were prepared by condensation of 5-chloro-2,4-disulfamylaniline (III) with the appropriate aldehyde or its acetal in a suitable solvent, usually in the presence of an acid catalyst.



Of the many types of 3-substituents in the 3-substituted 3,4-dihydrobenzothiadiazine dioxides thus synthesized the 3-haloalkyl series was among the more noteworthy. In the halomethyl series the dihalomethyl compounds were found to be far more active than their mono or trihalomethyl counterparts as determined by oral studies in animals. Thus the activities of the monochloromethyl, dichloromethyl, and trichloromethyl compounds were found to be approximately two, fifteen, and one-half, respectively, relative to hydrochlorothiazide taken as one.

3-Dichloromethyl-6-chloro-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide, II, $R = CHCl_2$, has been extensively tested orally in rats and dogs for its effect on electrolyte excretion and urine flow rates. These studies showed that the compound was ten to twenty times as potent as hydrochlorothiazide, one hundred to two hundred times as potent as chlorothiazide and exhibited a low order of toxicity. The greatly increased sodium and chloride ion excretion rates showed virtual correspondence with the enhanced urine flow rate. The output of potassium and bicarbonate ions was not materially affected and in this connection it is interesting that the compound was found to be a very weak carbonic anhydrase inhibitor. Clinical trials[3] have confirmed the potency ratio determined in animal experiments and have also demonstrated a significant reduction in the excretion of potassium ion relative to sodium ion compared with chlorothiazide and hydrochlorothiazide.

Margaret H. Sherlock,
N. Sperber, and J. Topliss

Medicinal Chemical Research Department, Schering Corporation, Bloomfield (New Jersey), January 12, 1960.

Zusammenfassung

Die Synthese und diuretische Aktivität von 3-Haloalkyl-dihydrobenzothiadiazin-dioxyden, insbesondere 3-Dichloromethyl-6-chlor-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxyd, II, $R = CHCl_2$, werden beschrieben.

Some Histochemical Observations on the Cuticle of Fasciola indica Verma, 1953

Presence of -S-S- bonding and polyphenol which may act as precursor of tanning, have been reported in the external cortical layer of certain nematodes like *Ascaris* and *Proleptus obtuses*[1–3]; but little attention seems to have been paid to the study of cuticle of trematodes. In the present investigation the authors have made histochemical observations on the cuticle of the trematode *Fasciola indica* Verma, 1953, recovered from the liver of freshly killed buffalo. Live specimens of the trematode brought to the laboratory in a thermos-flask containing physiological saline at 37°C were used for this purpose. Frozen and paraffin sections, as well as thin strips cut along the margin of the flattened worms (containing only the integument), were studied. Methods described by Cowdry[4], Pearse[5], Trim[6], and Smyth[7,8] were employed for testing presence of proteins, fats, phenols, aromatic crosslinkage, and -S-S- bonds.

The results of the various histochemical tests on the cuticle of *Fasciola indica* have been summarized in the following Table.

Groups	Tests	Results
Proteins	Biuret	Positive
	Xanthoproteic	Positive
Glycol group	P.A.S.	Positive (pink)
	P.A.S. after chloroform extraction	Positive
	P.A.S. after saliva treatment	Positive
	P.A.S. after acetylation	Negative
	P.A.S. after 0·1 *N* KOH treatment of acetylized sections	Positive
	γ-metachromasia with Toluidine blue	Negative
	Methylene blue binding below pH 4	Negative
Phenols, aromatic linkage	Ferric chloride	Negative
	0·2% Catechol	Negative
	Malachite green (G. T. Gurr)	Negative
-S-S- bonds	Thioglycocollate	Negative
	Alkaline lead acetate	Negative
Fats	Sudan IV	Negative

The positive Biuret and Xanthoproteic tests obtained in this work are sufficient evidences of the proteinaceous nature of the cuticle. The cuticle also gave a positive P. A. S. reaction. However, the nature of the exact substance causing this reaction could be ascertained only after chloroform extraction, saliva treatment, acetylation, and lastly after alkali treatment of acetylized material, and this in logical sequence demonstrated the presence of

[1] C. H. Brown, Nature *165*, 275 (1950).
[2] C. H. Brown, Personal communication to von Brand (1952).
[3] A. F. Bird, *Exp. Parasitol. 6*, 383 (1957).
[4] E. V. Cowdry, *Laboratory technique in Biology and Medicine*, 2nd Ed. (The William & Wilkins Co., Baltimore 1948).
[5] A. G. E. Pearse, *Histochemistry Theoretical & Applied* (J. & A. Churchill Ltd., London 1953).
[6] A. R. Trim, Biochem. J. *35*, 1088 (1941).
[7] J. D. Smyth, Stain techn. *26*, 255 (1951).
[8] J. D. Smyth, Quart. J. micr. Sci. *95*, 139 (1954).

1:2 glycol group in the protein. These results are in agreement with similar observations made by Gersh[9] and McManus[10] in some other cases. The absence of a γ-metachromasia reaction with Toluidine blue, supported by a negative Methylene blue binding below pH 4, would suggest the presence of muco or glycoprotein containing 1:2 glycol group. As stated by Pearse[5], the glycoproteins having hexosamine content of less than 4% stain weakly by P.A.S. (usually paler red or pink) while the mucoproteins stain deep purplish-red. Since the colour obtained by P.A.S. reaction was pink, the cuticle of *Fasciola indica* possibly does contain glycoproteins.

The results of the other histochemical tests given in the Table show absence of phenols, -S-S- bonds and unsaturated lipids.

M. B. Lal and S. C. Shrivastava

Department of Zoology, The University, Lucknow (India), September 15, 1959.

Résumé

Les essais histochimiques pour la présence des protéïnes, graisses, phénols et réticulation aromatique (aromatic cross linkage) et des liaisons -S-S ont été faits sur le cuticule de *Fasciola indica* Verma, 1953, trematode se trouvant dans le foie du buffle indien. Des résultats positifs pour les protéïnes (le groupe glycol) et négatifs pour les graisses, phénols et réticulation aromatique et les liaisons -S-S ont été obtenus.

[9] I. Gersh, Arch. Path. *47*, 99 (1949).

[10] J. F. A. McManus and J. E. Cason, J. exp. Med. *91*, 651 (1950).

Quantitative Unterschiede der Serummukoproteine bei verschiedenen Spezies

Unter Serummukoproteinen (SMP) versteht man eine Fraktion der Glykoproteine, die saure Mukopolysaccharide in polarer oder anderer leicht trennbarer Bindung an Proteine enthält. Saure Mukopolysaccharide sind Substanzen, die sich aus Hexosaminen, Uronsäuren und Schwefelsäureestern zusammensetzen[1]. Die SMP sind chemisch unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie mit Perchlorsäure nicht fällbar sind, durch Phosphor-Wolframsäure jedoch präzipitiert werden. Man findet in der Literatur[2] allerdings auch die Annahme, dass diese chemischen Eigenschaften vor allem den sogenannten Serummukoiden zustünden, Glykoproteinen, welche Hexosamine in relativ grosser Menge von mehr als 4% in fester Bindung an Proteine enthalten. Die genaue Konstitution dieser Körper sowie ihre Herkunft ist noch nicht geklärt.

Eine ausgeprägte Erhöhung der SMP wird bei Gewebszerfall, vor allem im Verlauf von Entzündungen sowie bei malignen Tumoren gefunden, weshalb die quantitative Bestimmung der SMP in die klinische Laboratoriumsdiagnostik eingeführt wurde. Die Serumwerte sind bei gesunden Individuen sehr konstant.

Im Verlauf unserer Untersuchungen konnten wir bemerkenswerte quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies finden, die wir nachstehend wiedergeben. Möglicherweise lassen sich daraus Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieser Substanzen ableiten.

Methodik und Ergebnisse. 3–5 ml Blut werden sofort nach Entnahme abzentrifugiert und 0,5 ml Serum mit 4,5 ml einer 0,85% NaCl-Lösung versetzt. Nach Hinzufügen von 2,5 ml einer 1,8 *n* Perchlorsäure und Mischen durch zweimaliges Wenden werden die Proben 15 min stehengelassen. Nach Präzipitation wird durch ein Filterpapier (SS-Blaubandfilter) filtriert und 5 ml des Filtrats mit 1 ml einer 5% Phosphor-Wolframsäure versetzt. Die durch die neuerliche Präzipitation aufgetretene Trübung wird nach 30 min quantitativ im Rouy-Photrometer von Leitz bei Filter A und Wasser als Vergleichswert abgelesen. Bei dieser Methode gibt eine wässerige Lösung, die 200 µg Rinderalbumin-N in 5 ml enthält, die gleiche Trübung wie Serum, welches 252 mg% Mukoproteine enthält[3].

n	Ratten SMP in mg%	Menschen SMP in mg%	Kaninchen SMP in mg%	Hühner SMP in mg%
1	61	56	27	22
2	61	51	32	27
3	51	41	27	22
4	61	41	32	22
5	51	46	41	34
6	61	46	34	36
7	71	61	36	
8	61	56	32	
9	66	66	41	
10	66	61		
11	56	66		
12	56	66		
13	66			
14	56			
—	60,2	54,8	33,5	27,1

Die angeführten Spezies unterscheiden sich untereinander hoch signifikant ($p < 0{,}01$) mit Ausnahme der Kaninchen und Hühner, zwischen denen ein Unterschied nur wahrscheinlich ist ($p > 0{,}1$).

Diskussion. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Kaninchen und Hühner im Vergleich zu Ratten und Menschen sehr niedrige Normalwerte aufweisen. Diese Korrelation ist insofern bemerkenswert, als bekanntlich Kaninchen und Hühner sehr wenig Gewebsmastzellen, hingegen reichlich Blutbasophile aufweisen. Diese beiden Tierarten sind auch die einzigen, bei denen sich durch Fettmast eine ausgeprägte Arteriosklerose erzielen lässt. Ratten weisen zahlreiche Gewebsmastzellen, jedoch kaum Blutbasophile auf. Eine Korrelation zwischen Mastzellzahl und Arteriosklerose wurde postuliert[4]. Da die Gewebsmastzellen unter anderem die Hauptträger von Heparin bzw. heparinoiden Substanzen sein dürften, wäre es denkbar, dass ein Mangel an diesen Substanzen sich einerseits in einem niedrigen Mukoproteinspiegel anzeigt, andererseits aber auch durch ein vermindertes Fettklärungsvermögen zur Arteriosklerose bei Belastung führt.

H. Braunsteiner, P. Niederberger und S. Sailer

II. Medizinische Universitätsklinik in Wien, 29. Februar 1960.

[1] R. J. Winzler, *Glykoproteins of Plasma*, CIBA-Foundation, Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharids (London 1958), p. 246.

[2] R. Winzler, *Glykoproteins of Plasma*, CIBA-Foundation, Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharids (London 1958), p. 251.

[3] J. de la Huerga, A. Dubin, D. S. Kushner, H. A. Dyniewicz und H. Popper, J. Lab. clin. Med. *47*, 403 (1956).

[4] P. Constantinides, Science *117*, 505 (1953).

Summary

Rabbits and chicken which easily get experimental arteriosclerosis, have very low values of serum mucoproteins. High values are found in rats, where they are significantly higher than in men.

Elaboration of Vitamin B_{12} by *Escherichia coli*[1]

Uncertainties regarding the role played by cyanocobalamin (B_{12}) and methionine in the metabolism of microorganisms induced us to study the elaboration of B_{12}-active material by *Escherichia coli* which would satisfy the B_{12}-requirement of *Euglena gracilis*, *Ochromonas malhamensis*, and *Lactobacillus leichmannii*. For this purpose we used the mutant strain, *E. coli* 113-3, its parent strain (ATCC No. 9637) and a wild type *E. coli* isolated from normal human feces.

Since the mutant *E. coli* 113-3 has a nutritional requirement alternatively satisfied by B_{12} or methionine[2], the experiments reported below were designed to permit inferences as to the role of methionine in biosynthesis of B_{12}-like metabolites.

Methods: *E. coli*. For the experiments reported here we used a wild type *E. coli* ATCC 9637, the parent of 113–3, which served as prototrophic control for the mutant *E. coli* 113-3. These organisms were grown for 3 days in Burkholder's medium[3]; the cells were collected by centrifugation, resuspended in distilled water, and lyophilized. Supernatants from each organism were concentrated 10-fold under reduced pressure. Their B_{12} content was assayed.

B_{12} assays: Methods for the determination of B_{12} using *E. gracilis Z.*, *O. malhamensis*, and *L. leichmannii* as test organisms have been outlined[4]. Samples of the supernatants and lyophilized organisms were autoclaved at pH 4·5 with metabisulfite to liberate and stabilize B_{12}. This hydrolysis is insufficient to break down deoxyribosides.

Results: The concordant low values by the *Ochromonas* and *Euglena* assays (Table), show little assayable B_{12} in the bodies and the supernatant of methionine-grown *E. coli* 113-3; the high initial values obtained with *L. leichmannii* for the culture fluids of methionine-grown *E. coli* 113-3 are almost certainly attributable to deoxyribosides. We assume that the *O. malhamensis* assay yields values closest to the true B_{12}-content[4].

Very little B_{12} was found in both wild type *E. coli* strains grown with neither methionine nor B_{12}. The stimulation by methionine of B_{12}-production (see supernatant values Table) in wild type *E. coli* (from feces) supports Bray and Shemin's[5] finding that most of the angular methyl groups of B_{12} can originate from methionine. Not all *E. coli* strains show this effect, as demonstrated by the failure of methionine to stimulate B_{12}-production in *E. coli* 9736 and its mutated strain.

When B_{12}-activity of cells, as assayed with either *O. malhamensis* or *E. gracilis*, is deducted from the *L. leichmannii* results, the difference may be attributed to the presence of deoxyribosides. Supplmentation for all three *E. coli* strains with B_{12}, but not with methionine, resulted in striking increases of deoxyribosides.

The low content of assayable B_{12} in supernatants from *E. coli* 113-3 cells grown on methionine, implies that B_{12}-by-passing factors for the assay organisms are absent here. Further analysis of the B_{12}-by-passing problem may require the use of natural B_{12}-free materials, prepared biologically, perhaps by microorganisms. These compounds may be of restricted distribution and could embody 1-carbon fragments such as the methyl purines and methyl pyrimidines recently described by Littlefield and Dunn[6]. The lack of B_{12} activity in yeast and higher plants originally signalled that B_{12} has a restricted distribution compared with other B vitamins; the present results suggest that B_{12} by-passing compounds are even more restricted in distribution.

Vitamin B_{12}-content of *Escherichia coli*.
'B_{12}' of the culture medium = cyanocobalamin; 'meth.' = methionine. B_{12} content is expressed as μμg/ml for culture supernatants and μμg/mg for dried cells

A. Dried Cells (μμg/mg)

Organism	Metabolite added/liter	Assay System *L. leichmannii*	*O. malhamensis*	*E. gracilis*
E. coli wild-type isolate	no B_{12}, no meth.	16	0·6	0·65
	meth. 0·1 g	7	10	10
	B_{12} 0·1 μg	600	50	26
E. coli 113–3	meth. 0·1 g	39	3	3
	B_{12} 0·1 μg	850	130	306
E. coli 9736	no B_{12}, no meth.	27	3	6·6
	meth. 0·1 g	30	3·7	4·0
	B_{12} 0·1 μg	300	75	70

B. Supernatants (μμg/ml)

Organism	added/liter	*L. leichmannii*	*O. malhamensis*	*E. gracilis*
E. coli wild-type isolate	no B_{12}, no meth.	104	6	1
	meth. 0·1 g	298	200	235
	B_{12} 0·1 μg	1500	463	800
E. coli 113–3	meth. 0·1 g	563	10	9
	B_{12} 0·1 μg	740	175	604
E. coli 9736	no B_{12}, no meth.	100	20	6
	meth. 0·1 g	60	6	10
	B_{12} 0·1 μg	130	2	10

H. Baker, O. Frank, I. Pasher, H. Sobotka, H. A. Nathan, S. H. Hutner, and S. Aaronson

Department of Chemistry, Mount Sinai Hospital, New York and Haskins Laboratories, New York, December 24, 1959.

Résumé

Les auteurs ont constaté l'absence de la vitamine B_{12} dans le corps 1° de *E. coli* 113-3, 2° de son parent prototrophique et 3° dans la souche sauvage. Le titre de B_{12} dans le milieu de culture s'est trouvé fortement augmenté par la méthionine, dans le cas de la souche sauvage uniquement. En ajoutant de la cyanocobalamine on a obtenu dans les trois cas une augmentation de désoxyribosides.

[1] This work was supported by Grants A-1800 and A-1231 from the U. S. Public Health Service and Grants-in-Aid from the Loomis Foundation, the American Cancer Society, and the Nat. Ass. for Mentel Health.

[2] J. E. Ford and S. H. Hutner, *Vitamins and Hormones*, vol. 13 (Academic Press Inc., New York 1955), p. 101.

[3] P. R. Burkholder, Science *114*, 459 (1951).

[4] H. Baker, H. Sobotka, I. Pasher, and S. H. Hutner, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *91*, 636 (1956).

[5] R. Bray and D. Shemin, Biochim. biophys. Acta *30*, 647 (1958).

[6] J. W. Littlefield and D. B. Dunn, Biochem. J. *70*, 642 (1958).

Oestrogen Antagonisms: the Effects of Various Steroids on the Uterine Growth Produced in Mice by Oestriol

In a series of earlier papers we have surveyed the effects of various steroids on the uterine growth produced in mice by oestrone[1–3]. In extending the range of substances evaluated in the standard assay developed for those studies, a similar technique has been employed here to compare the effects of various steroids on the uterine weight increase produced by oestriol. Results from progesterone in this assay have already shown that it does not inhibit the uterine growth induced by 100 µg of oestriol, but that in contrast the response to oestrone at a dose of 0·3 µg can be diminished by progesterone[4].

The methods of this assay procedure were not remarkably different from those described in the papers cited above. Immature female Rockland mice, 22 to 25 days of age, received test compound in three daily, equal injections. 24 h after the final injection the mice were sacrificed, the uteri were removed, cleaned of adherent tissues, scored, and blotted to remove contained fluids and weighed wet on a torsion balance. All evaluations are based upon the mean weight of uteri from groups of 8–10 mice.

Oestriol, at a dose of 100 µg, was employed as a standard uterine growth stimulator. This dose of oestriol produced responses that varied between a low of approximately 30 and a high of about 45 mg. Compounds to be tested were either mixed in oil solution with the oestriol, or in the case of the glucocorticoids, were given in separate, microcrystalline suspensions.

Cortisone and cortisol, as the acetates, were each tested in a single assay (Table). Neither of these substances had any obvious effect. The absence of an inhibition of oestriol-induced uterine growth by these glucocorticoids is similar to the results obtained in our oestrone test in which the glucocorticoids were inactive[3].

Absence of effects of cortisone acetate and cortisol acetate on the uterine growth produced by 100 µg of oestriol

Dose (µg) Oestriol	Dose (µg) Cortisone Acetate	N	Uterine Weight (mg)
100	0	9	34·9
100	100	9	33·6
100	300	10	36·3
100	1000	10	34·2
0	0	9	11·2
Average Uterine weight = 34·3. Slope of least squares line = 0·54 ± 2·89, not significantly different from 0			
Dose (µg) Oestriol	Dose (µg) Cortisol Acetate	N	Uterine Weight (mg)
100	0	10	32·0
100	30	10	38·2
100	100	10	40·6
100	300	9	35·2
100	1000	10	34·9
0	0	9	15·3
Average Uterine weight = 36·2. Slope of least squares line = 2·99 ± 2·03, not significantly different from 0			

Desoxycorticosterone acetate was studied in a series of tests in which the uterine response to the 100 µg dose of oestriol averaged 36 mg (Fig. 1). Inspection of the data suggested no remarkable effect of DCA on oestriol-induced uterine growth. This was confirmed by the fact that the slope of the least-squares dose-response curve was not significantly different from zero. Like the progesterone data cited above[4], DCA inhibited oestrone-induced uterine growth[3] while having little or no effect upon the growth produced by oestriol.

Testosterone propionate proved to be a blocker of oestriol-stimulated uterine growth (Fig. 2). Doses of 300 and 1000 µg of TP produced inhibition of this growth.

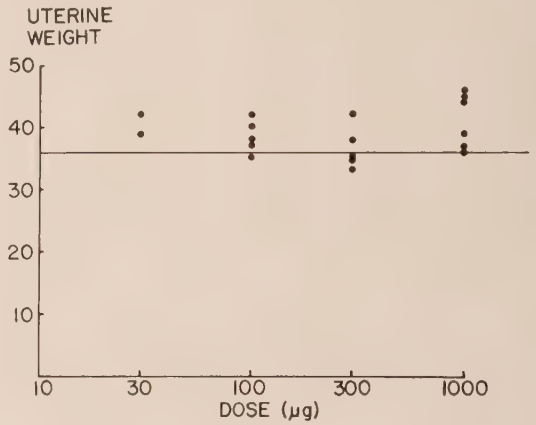


Fig. 1: Lack of effect of desoxycorticosterone on the uterine response to 100 µg of oestriol. Response of controls to 100 µg oestriol alone is shown by the horizontal line. In the five experiments summarized here, the average uterine weight of simultaneous, oil-treated controls was 15·44 mg. Average uterine weight = 38·33 mg. Slope of least squares line = 0·48 ± 1·72, not significantly different from 0

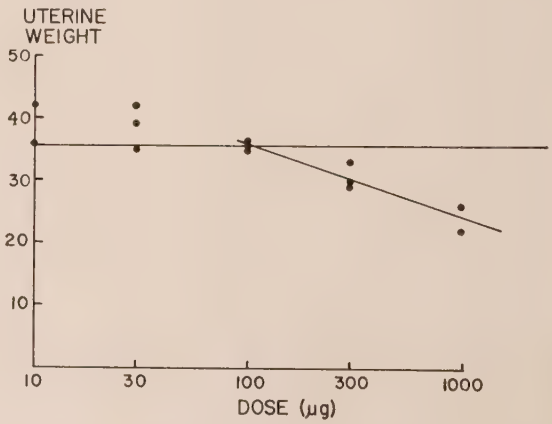


Fig. 2: Effect of testosterone propionate on the uterine response to 100 µg of oetriol. The horizontal line shows the control response to oestriol alone. In the three experiments summarized here, the average uterine weight of simultaneous, oil-treated controls was 9·84 mg. Uterine weight = 36·5–11·6 (log dose – 2·00) for doses of TP from 100 to 1000 µg. $b = -11·6 \pm 1·53$

[1] R. A. Edgren and D. W. Calhoun, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *94*, 537 (1957).

[2] R. A. Edgren, D. W. Calhoun, R. L. Elton, and F. B. Colton, Endocrinology *65*, 265 (1959).

[3] R. A. Edgren and D. W. Calhoun, in preparation.

[4] R. A. Edgren, R. L. Elton, and D. W. Calhoun, in preparation.

On the other hand, doses of 10, 30, and 100 μg of TP diminished the growth produced by 0·3 μg of oestrone[1]. Thus a ratio of 3:1 to 10:1 testosterone to oestriol was inhibitory whereas a ratio of at least 33:1 testosterone to oestrone was required to produce inhibition. Testosterone would appear to be at least three times more effective as an oestriol antagonist than as an oestrone antagonist.

Thus the uterine growth produced by oestriol at a single dose of 100 μg was blocked by the simultaneous administration of testosterone propionate. On the other hand, this growth was not significantly affected by cortisone, cortisol, desoxycorticosterone, or progesterone. Oestrone-induced uterine growth (0·3 μg) in a test of this type was inhibited by DCA and aldosterone, testosterone propionate, and progesterone – only the glucocorticoids were inactive among naturally occurring, non-oestrogenic types of steroids. This difference in pattern of blockage led us to suggest that there were two receptor sites for steroids in the uterus[5]. According to this hypothesis one site (A) would accept oestrone, DCA, progesterone, and testosterone propionate and the other site (B) oestriol and testosterone. Further experiments (unpublished) have forced a modification of this hypothesis since some of the oestriol appears to attach to site A. Additional studies are in progress in an attempt to complete this dual receptor site hypothesis and to clarify the mechanisms involved in uterine growth.

R. A. Edgren and D. W. Calhoun

Division of Biological Research, G. D. Searle & Co., Chicago (Illinois), October 1, 1959.

Zusammenfassung

Das in juvenilen Mäusen durch Oestriol (100 μg) stimulierte Uteruswachstum wurde durch Testosteronpropionat blockiert. Mit Cortisonacetat, Cortisolacetat, Deoxycorticosteronacetat und Progesteron wurde keine solche Wirkung erzielt.

[5] R. A. Edgren and D. W. Calhoun, Anat. Rec. *134*, 558 (1959).

Stimulation of Plant Development by Some Uracil Analogues

Some time ago we were able to show that the organs of germinating seeds are the site of intensive nucleic acid synthesis[1]. For this reason, the first stages of germination appear to be particularly suitable for studying the effects of biologically active analogues of nucleic acid components. In pursuance of this line of investigation, we had earlier studied[2] the effect of 5-bromouracil, a compound known to inhibit the growth of certain microorganisms[3,4], on germinating plants, and found that at certain concentrations it not only failed to inhibit growth, but markedly stimulated development of the plants. A number of further derivatives of uracil were examined for analogous effects, and a number of them were found to stimulate the development of certain plants not only during germination, but also during the later vegetative period[5].

In the last few years, we have carried out field trials on crop plants using 5-bromouracil and 5-nitrouracil, which had proved most effective in laboratory experiments. The seeds were treated as in earlier work, by soaking them in solutions containing 5 to 50 μg of the stimulators per ml for 24 h just prior to sowing. The most general result of such a single treatment with 5-bromouracil is an accelerated development of the plants which in some cases may persist up to the time of harvesting. For instance, treated tomatoes on the average ripen 10 to 14 days earlier than untreated controls, and in the case of lettuce the first harvest from treated seeds is about 20% higher than from controls. The effect of 5-nitrouracil on lettuce is similar. The same compound increases the yield of cucumbers to a statistically significant extent – about 20–40% above that of controls (seeds soaked in water for the same period). The cucumbers treated with 5-nitrouracil show certain morphological peculiarities in the course of development. The ovaries of such plants begin to elongate much earlier so that at the full development of the perianth they are 4–5 times longer than the ovaries of control plants at the same stage of development. The ovaries of the treated plants do not lie along the ground, as is usual with cucumbers but are characteristically erect.

In an effort to elucidate the mechanism of stimulation, we first studied the tissues of stimulated plants cytologically. In certain cases, the stimulators were found to cause a massive increase in the number of mitoses. Thus, in the roots of onions (*Allium cepa*) allowed to sprout in aqueous solutions of the stimulators, the number of mitoses after 4 to 8 days is markedly higher than in the controls sprouting in water; 5-bromouracil at 10 μg/ml and 100 μg/ml was found to increase the number of mitoses by 30% and 60% respectively on the fourth day, and by 70% and 35% respectively on the eighth day.

We further attempted to follow the metabolic fate of 5-bromouracil in plants. The experiments were carried out with germinating cucumbers grown under standard conditions and infiltrated with 0·001 *M* solutions of 5-bromouracil-2-^{14}C[6]. After 3 h and 18 h, no combined 5-bromouracil was found in the nucleotide fraction, nor in the ribonucleic or deoxyribonucleic acids obtained according to Ogur and Rosen[7]. This finding indicates that the fate of 5-bromouracil in the plant organism differs distinctly from its fate in microorganisms in which it is known to be able to replace a considerable proportion of the thymine in deoxyribonucleic acid[8]. This difference is presumably due to the fact that 5-bromouracil is rapidly degraded in the plant. When seedlings are incubated after infiltration with 5-bromouracil, this degradation may be followed by the evolution of $^{14}CO_2$, which reaches a maximum after only 1 h incubation. However, 5-bromouracil does have a distinct effect on the metabolism of the purine and pyrimidine bases, particularly of uracil. Plants infiltrated with uracil-2-^{14}C together with (unlabelled) 5-bromouracil show a distinctly decreased rate of degradation of uracil to $^{14}CO_2$ as against control plants infiltrated

[1] Z. Šormová and F. Šorm, Chem. listy *50*, 629 (1956); Coll. Czechosl. chem. Comm. *21*, 1043 (1956).

[2] Z. Šormová, F. Šorm, J. Bauerová, and M. Zelinková, Fiziologia rastenij *3*, 204 (1956).

[3] G. H. Hitchings, E. A. Falco, and M. B. Sherwood, Science *102*, 251 (1945).

[4] F. Weygand, A. Wacker, and H. Dellweg, Z. Naturf. *7b*, 19 (1952).

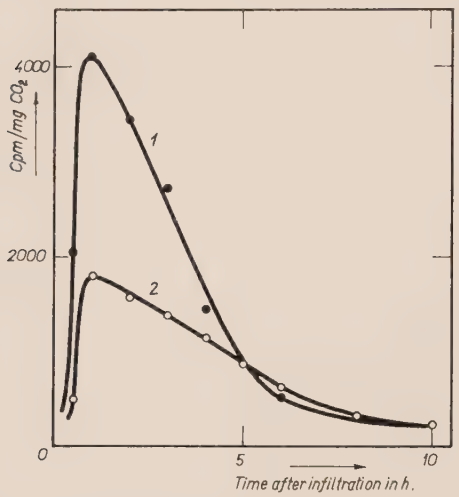
[5] Czechoslovak Patent 87672.

[6] The labeled 5-bromouracil was prepared by Dr. J. Morávek of the Institute for Research, Production, and Utilisation of Radioisotopes, Prague.

[7] M. Ogur and G. Rosen, Arch. Biochem. *25*, 262 (1950).

[8] S. Zamenhof, B. Reiner, R. de Giovanni, and K. Rich, J. biol. Chem. *219*, 165 (1956).

with the labelled uracil alone (Fig.). At the same time, there is an increase in the specific activity of the free uracil nucleotides; even after 20 h incubation, the specific activity of these nucleotides is still twice as high as in the control group. If labelled orotic acid is substituted for uracil in an analogous experiment, there is no corresponding increase in the specific activity of the free nucleotide fraction in the presence of unlabelled 5-bromouracil. The infiltration of labelled uracil together with unlabelled 5-bromouracil was also found to lead to a distinct increase in the specific activity of the ribonucleic and deoxyribonucleic acid fractions after 20 h – by 40% and 125% respectively above the values of the control group.



Inhibition of the degradation of uracil by 5-bromouracil. The specific activity of the CO_2 was determined after absorption in 0·25 *N* NaOH and precipitation of $BaCO_3$. The values are corrected for self-absorption. The total amount of CO_2 evolved was the same in both experiments. 1: after infiltration with 0·3 *mM* uracil-^{14}C; 2: after infiltration with 0·3 *mM* uracil-^{14}C 1·0 *mM* 5-bromouracil. The activities were measured in the Isotope Laboratory of this Institute

Our results show that these uracil derivatives exert profound effects on the development and metabolism of plants. The protracted nature of these effects is all the more interesting in view of the fact that they result from only a single treatment with low concentrations of the active substances in the earliest stages of germination. This, together with the observed morphological changes, points to the possibility of genetic effects; this problem is at present under investigation.

This work will be reported in full in the Collection of Czechoslovak Chemical Communications.

Z. Šormová, K. Šebesta, J. Bauerová, O. Melichar, and F. Šorm

Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague, December 4, 1959.

Zusammenfassung

Es wurde eine entwicklungsfördernde Wirkung von 5-Bromuracil und 5-Nitrouracil bereits in geringen Mengen auf manche Pflanzen (unter anderem Tomaten, Gurken und Gartenlattich) festgestellt. 5-Bromuracil wird dabei nicht in die Pflanzennukleinsäuren eingebaut, sondern unterliegt einem schnellen Abbau; weiterhin verursacht der Stoff eine Hemmung des Uracilabbaues. Die Möglichkeit einer Beeinflussung der genetischen Eigenschaften wird diskutiert.

Cytologie fine des cellules interstitielles du testicule du poisson *Lebistes reticulatus* R.

Les travaux de Champy[1], Van Oordt[2], Stephan et Clavert[3] ont posé le problème de l'existence et de la morphologie de ces cellules dans le testicule des Cyprinodontes. Chez *Lebistes reticulatus* R.[3] les cellules interstitielles actives sont caractérisées par la présence de granules éosinophiles et d'inclusions lipidiques soudanophiles.

Résultats. Les techniques histologiques et histochimiques permettent de distinguer 3 catégories de cellules interstitielles:

1° des cellules à cytoplasme clair dont le noyau volumineux se colore d'une façon homogène et intense à l'hématoxyline ferrique (ces éléments prédominent dans le testicule jeune);

2° des cellules à cytoplasme chargé en granulations éosinophiles;

3° des cellules contenant des mottes grossières de pigment jaune.

Le nombre des cellules à pigment augmente sensiblement avec l'âge du poisson. Les pigments accumulés résistent aux solvants des graisses. Sur coupes à la paraffine colorées à l'hématoxyline éosine, ils présentent leur couleur propre jaune orangé. Par ailleurs, ils présentent les caractères généraux de coloration des lipides: osmiophilie, coloration au noir soudan et au bleu de nil. Ils se colorent assez fortement au P.A.S. Le test de Schmorl est fortement positif mais la réaction argentaffine selon Masson reste négative. L'ensemble de ces caractéristiques histochimiques permet de conclure à des pigments de nature lipidique, de la famille des lipofuscines.

Au microscope électronique (fixation Palade; méthacrylate de butyle – Philips E. M. 100), les contours des cellules interstitielles sont très irréguliers; de nombreuses digitations sont plus ou moins intriquées. Souvent elles ne sont séparées des capillaires que par un mince espace clair contenant des fibrilles collagènes. Deux caractères différencient ces cellules d'éléments conjonctifs banaux:

a) leurs mitochondries volumineuses et denses renfermant de fins tubules d'un diamètre de 400 Å environ. Ce type de mitochondrie a été décrit dans les cellules interstitielles du testicule de mammifère (Fawcett et Burgos[4]) et d'une façon générale dans les organes producteurs de stéroïdes (Belt et Pease[5]);

b) leur richesse en vésicules, souvent disposées en chaînettes, constituant le système réticulaire endoplasmique.

Les grains de Palade, peu nombreux, dispersés dans la matrice cytoplasmique, ne sont que rarement disposés sur la paroi externe des vésicules du système réticulaire endoplasmique: ces vésicules sont en majorité de type lisse. Le noyau arrondi de contour régulier, présente un aspect normal et renferme une substance nucléaire finement granuleuse, répartie de façon homogène. Le nucléole

[1] Ch. Champy, C. r. Soc. Biol., Paris *88*, 414 (1923).

[2] G. van Oordt, Brit. J. exp. Biol. *3*, 43 (1925).

[3] F. Stephan et J. Clavert, C. r. Soc. Biol., Paris *127*, 438 (1938).

[4] D. W. Fawcett et M. Burgos, Ciba Found. Coll. on ageing *2*, 86 (1956).

[5] W. D. Belt et D. C. Pease, J. biophys. biochem. Cytol. *2*, 369 (1956).

Fig. 1

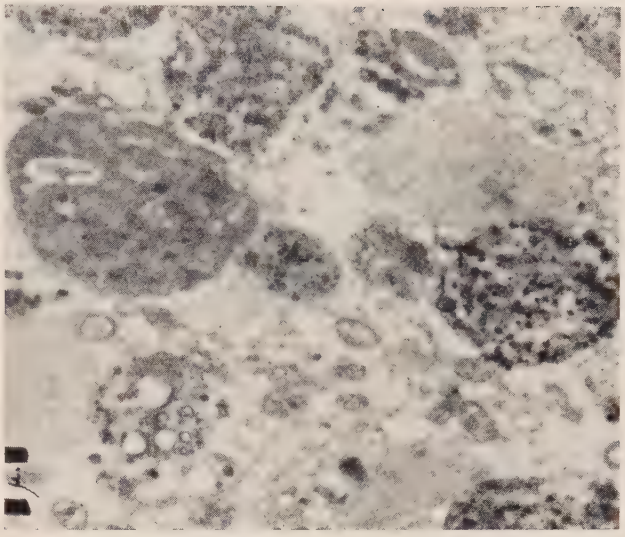


Fig. 3

est de petite taille. A proximité du noyau se trouve un complexe vésiculo-membraneux de Golgi.

La richesse en mitochondries, le développement du système réticulaire endoplasmique parlent en faveur d'une activité sécrétoire importante de ces éléments, qui représentent le stade jeune actif des cellules interstitielles.

L'étude d'un grand nombre de cellules permet de saisir les images caractéristiques de l'élaboration et de l'accumulation des pigments. Ceux-ci se forment à partir d'une substance matricielle finement fibrillaire, formant d'abord de petites plages assez bien délimitées, qui confluent ultérieurement pour former des corps ovoïdes à limites nettes (Fig. 2). Dans ces plages apparaissent de fines mottes de condensation granulaire de plus en plus nombreuses, aboutissant à la formation d'amas volumineux de pigment. Le pigment mature est formé de grains homogènes très osmiophiles, grossièrement sphériques, cernés d'un espace clair.

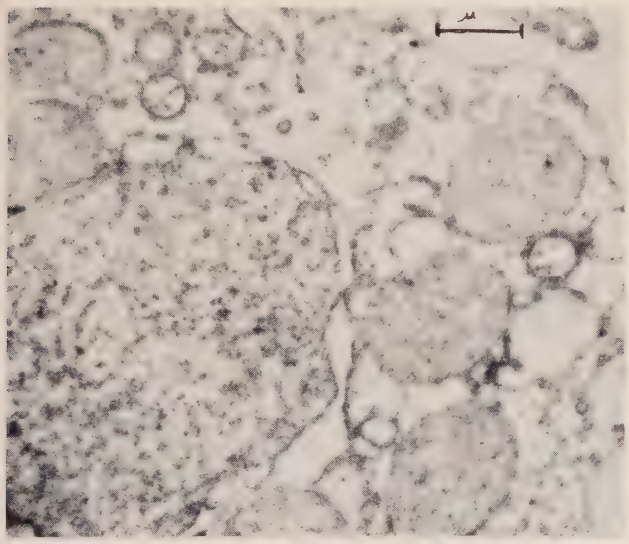


Fig. 2

L'apparition de plages fibrillaires et l'élaboration de pigment coïncident avec une véritable désintégration des structures cytoplasmiques. Le démasquage des lipides de constitution du cytoplasme (lipophanérose; Policard *et al.*[6,7]) explique les diverses images observées: vacuoles associées aux dépôts osmiophiles, figures myéliniques, élaboration de pigment (Fig. 3). Les pigments du type lipofuscine auraient donc bien la signification de «pigment d'usure» (Abnutzungspigment).

Discussion et conclusion. Certaines cellules intertubulaires du testicule de *Lebistes reticulatus* présentent les caractéristiques des cellules de Leydig. Les cellules interstitielles qui présentent en optique des granulations éosinophiles et du matériel soudanophile, ne correspondent pas à des éléments actifs, mais à des éléments en voie de dégénérescence. Les cellules responsables de la sécrétion hormonale (Follenius[8]) sont très probablement les cellules à cytoplasme clair qui prédominent dans le testicule au moment de la différenciation des caractères sexuels.

E. Follenius et A. Porte

Laboratoire de Zoologie et Embryologie expérimentale, Faculté des Sciences et Institut d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, le 25 novembre 1959.

Summary

The active interstitial cells of the testis of *Lebistes reticulatus* R. have numerous, big, dense mitochondria of tubular structure and a developed endoplasmic reticulum. The formation of lipochrome pigment granules corresponds to a degenerative evolution of these cells.

[6] A. Policard, A. Collet et S. Pregermain, Bull. Micr. appl. *7*, 49 (1957).

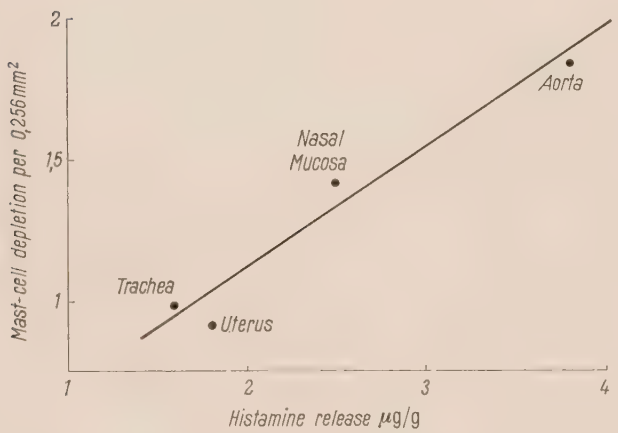
[7] A. Policard, A. Collet et S. Pregermain, Bull. Micr. appl. *8*, 88 (1958).

[8] E. Follenius, Bull. biol. *87*, 1 (1953).

The Histamine Content of Guinea Pig Mast Cells

As reported in an earlier communication, the mast-cell count in different guinea pig tissues shows close correlation to the total histamine content and to anaphylactic histamine release (Boréus and Chakravarty[1]). The histamine release was associated with a significant decrease in the mast-cell count. The same method has been used in the present investigation to study (1) the correlation between mast-cell depletion and histamine release following antigen-antibody reaction, and (2) the average histamine content of the individual mast cells in different tissues of the guinea pig.

It was shown in our previous paper that the anaphylactic histamine release from aorta, trachea, and uterus was associated with a mast-cell depletion, the ratio between the two being about the same. The observations were then extended to the nasal mucosa, which has a high mast-cell population (Boréus[2]). In all four tissues the histamine release was correlated to the mast-cell depletion, as shown in the Figure.



Correlation between mast-cell depletion and histamine release in guinea pig tissues following antigen-antibody reaction *in vitro*

The close correlation between the mast-cell count and the histamine content in different tissues suggests that most of the tissue histamine is located in the mast cells. Assuming this, it was possible to calculate the average histamine in each mast-cell from the histamine value and mast-cell count per g of tissue. The weight of the counted sections could be estimated from their area and thickness and specific gravity (taken to be 1). Furthermore, if it is assumed that the released histamine comes from the mast cells, which can no longer be recognized after incubation with antigen and are considered to have 'disappeared', then the amount of histamine released from these cells may be calculated from the histamine release and the difference in mast-cell count in tissues incubated with and without antigen. The values are shown in the Table.

Four different tissues of guinea pig showed from 21 to 34 µµg histamine base per mast-cell, and the histamine release from each 'disappeared' mast-cell was from 12 to 17 µµg. The slightly lower value for histamine release per cell compared to the values for histamine content per cell could be due to rapid metabolization of a part of the released histamine.

Average histamine content and histamine release from guinea pig mast cells

	Aorta	Trachea	Uterus	Intestine[a] (Jejunum)
Histamine content (µµg) of each mast-cell (mean of 4 exper.)	25 ± 3	21 ± 1	31 ± 2	34 ± 4
Histamine release (µµg) from each 'disappeared' mast-cell (mean of 2 exper.)	16	12	17	

[a] There was no 'disappearance' of mast cells in the case of intestine.

It is of interest to note that mast cells from different tissues have about the same histamine content. Moreover, the values obtained by us in guinea pig tissue are of the same order as those of Riley[3] – 18 and 24 µµg – in calf and ox liver capsule. Graham *et al.*[4] reported 6·7 to 15·6 µµg/cell in different tissues of the dog, and 25·4 and 32·2 µµg/cell in parenchyma and capsule of beef liver. Haegermark *et al.*[5] have found an average histamine content of 15 to 30 µµg/cell in mast cells isolated from rat peritoneal fluid. It seems from our observations that the histamine content of mast cells is similar in different tissues of the guinea pig. The values are of the same order as those in other species.

L. O. Boréus and N. Chakravarty*

Department of Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), January 18, 1960.

Zusammenfassung

Von der Voraussetzung ausgehend, dass alles Histamin in den Mastzellen lokalisiert ist, wurde berechnet, dass jede Mastzelle in Aorta, Trachea, Uterus und Jejunum des Meerschweinchens 25–34 µµg Histamin-Base enthält. Die anaphylaktische Freisetzung des Histamins war proportional der Verminderung des Mastzellengehaltes und wurde zu 12–17 µµg/Mastzelle berechnet. Jejunum gab keine anaphylaktische Reaktion.

* Present address: Department of Pharmacology, University of Ottawa (Canada).

[1] L. O. Boréus and N. Chakravarty, Acta physiol. scand., in press (1960).

[2] L. O. Boréus, Acta physiol. scand., in press. (1960).

[3] J. F. Riley, *The Mast Cells* (E. & S. Livingstone Ltd. 1959), p. 73.

[4] H. T. Graham, O. H. Lowry, N. Wahl, and M. K. Priebat, J. exp. Med. *102*, 307 (1955).

[5] Ö. Haegermark, I.-L. Thon, and B. Uvnäs, Personal communication (1959).

A Crystalline Molybdophosphoric Complex of Folic Acid

The role of molybdenum in biological systems has been a subject of recent interest, since this trace metal is a prosthetic group of the metalloflavoprotein enzyme, xanthine oxidase[1,2]. Several reports on its metabolic role have appeared, which indicate a vital part for this mineral[3]. Prolonged studies conducted by us on the action of this metal have revealed a metabolic interrelationship with the tocopherols[4]. Observations derived from this work have yielded indirect evidence indicating the possibility of molybdenum forming complex phospho compounds *in vivo* with biologically vital organic molecules.

This prompted us to initiate a study of compounds of molybdophosphoric acid with known biologically vital substances. The first of this series; a complex of molybdophosphoric acid and α-tocopherol has been reported earlier[5] and its biological activity partially studied[6]. The present communication is a brief summary dealing with the preparation, characterisation, and biological activity of a crystalline compound of molybdophosphoric and folic acids.

Methods: A solution of analar molybdophosphoric acid (B.D.H.) in glacial acetic acid (Merck G. R. No. 60) 1 μmol/ml is gradually added to a saturated solution of folic acid in the same solvent until a clear precipitation occurs. The crystals of the precipitated compound are centrifuged, washed with glacial acetic and dried under partial vacuum in a cool dark place. A part of this substance is subjected to elemental analysis. The rest of it is dissolved in a minimum quantity of 0·1 *N* NaOH and neutralised to pH 7·0. The neutral solution of the crystalline complex is dialysed against glass distilled water at 4°C for 24 h and the resulting solution lyophilised. The solid complex is preserved in amber coloured vials.

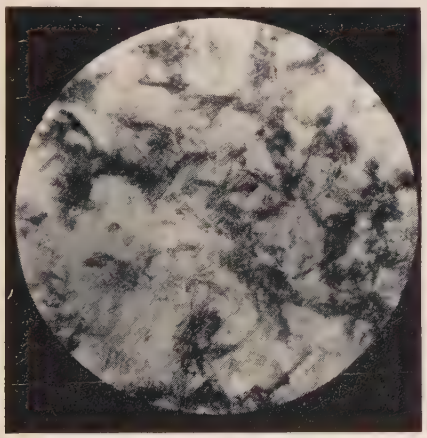


Fig. 1: Microscopic appearance of the molybdophosphoric-folic acid complex

A 2·5% solution in Michaelis buffer pH 8·5 and $\mu = 0{\cdot}1$ was dialysed against the same buffer for 48 h at 4°C. The dialysed sample was subjected to electrophoresis in the Kern LK 30 microelectrophoresis apparatus and molecular homogeneity established (Fig. 2).

Analytical data: The substance decomposes at 340°C. Found: C 37·3; H 4·2; N 13·2; P 0·5; Mo 18.7. $C_{194}\ H_{263}\ O_{102}\ N_{59}\ P\ Mo_{12}$ requires C 37·26; H 4·22; N 13·25; P 0·49; Mo 18·49. The molybdophosphoric acid used was of Analar grade with formula $H_3\ PO_4 \cdot 12\ Mo\ O_3$.

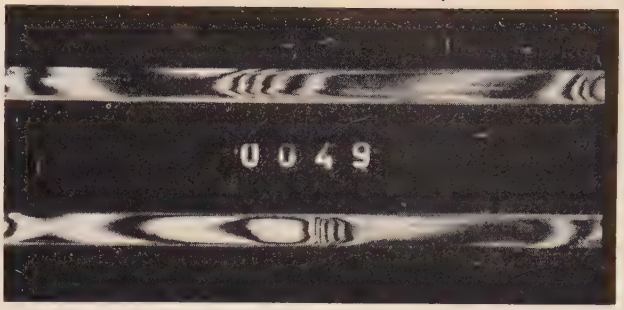


Fig. 2: Kern LK 30 electrophoretic pattern. Migration time 15 min at 6·0 v/cm – Michaelis buffer pH 8·5 $\mu = 0{\cdot}1$

Biological activity: Normal albino rats treated parenterally with this compound, 10 mg/kg b. w., exhibited a marked leucopenia. 24 h after administration of the test dose, there was an average fall of 4000 cells/mm³. Differential leucocyte count revealed a reversal of the normal picture as evidenced by a suppression of the agranulocytes (lymphocyte count) concomitant with a rise in the granulocytes (neutrophil count).

This complex exhibited antimetabolite activity against folic acid using *S. faecalis* R. as the test organism. Dose response against graded levels of folic acid has been noted by inhibition of growth of *S. faecalis* R. in a folic acid free basal medium.

The development of this crystalline substance is interesting in that it resembles in behaviour the folic acid antagonists such as aminopterin and methopterin[7], considered to be effective tools for inducing remissions in the acute leukemias[8].

This work will be published in fuller detail elsewhere.

Acknowledgement: The author is indebted to Dr. N. G. Magar, Department of Biochemistry, Institute of Science, Bombay, where part of this work was originally initiated, and to his present chief Professor V. Ramalingaswami for his encouragement. Grateful thanks are due to Dr. R. B. Colah, Haffkine Institute, Bombay, for the pure strain of *S. faecalis* R.

P. P. Nair

Department of Pathology, All-India Institute of Medical Sciences, New Delhi (India), August 30, 1959.

[1] D. A. Richert and W. W. Westerfeld, J. biol. Chem. *203*, 915 (1953). – W. W. Westerfeld, D. A. Richert, and E. S. Higgins, in: W. D. McElroy and B. Glass (Eds.), *A Symposium on Inorganic Nitrogen Metabolism* (Baltimore 1956).

[2] E. C. de Renzo, E. Kaleita, P. G. Heytler, J. Oleson, B. L. Hutchings, and J. H. Williams, Arch. Biochem. Biophys. *45*, 247 (1953). – E. C. de Renzo, P. G. Heytler, and E. Kaleita, Arch. Biochem. Biophys. *49*, 242 (1954).

[3] L. R. Arrington and G. K. Davis, J. Nutr. *55*, 185 (1955). – L. F. Gray and L. J. Daniel, J. Nutr. *53*, 43 (1954). – J. B. Neilands, F. M. Strong, and C. A. Elvehjem, J. biol. Chem. *172*, 431 (1948). – R. L. Shirley, R. D. Owens, and G. K. Davis, J. Nutr. *44*, 595 (1951).

[4] P. P. Nair, in: Doctoral thesis, *Metabolic Interrelationship Between Vitamin E and Molybdenum* (Univ. of Bombay 1956). – P. P. Nair and N. G. Magar, Indian. J. med. Res. *46*, 561 (1958). – P. P. Nair, N. G. Magar, and T. P. Bharadwaj, J. postgraduate Med. *2*, 163 (1956). – P. P. Nair and N. G. Magar, Curr. Sci. *27*, 208 (1958).

[5] P. P. Nair and N. G. Magar, J. Ind. chem. Soc. *33*, 475 (1956).

[6] P. P. Nair and N. G. Magar, Proc. Ind. sci. Congr. Abstr. *11*, 424 (1957).

[7] T. H. Jukes, E. L. R. Stokstad, and A. L. Franklin, N. Y. Acad. Sci. *52*, 1336 (1950).

[8] S. Farber, Blood *7*, 97 (1952).

Résumé

Un nouveau produit crystallin de l'acide folique avec l'acide molybdophosphorique est décrit. Ce produit a été soumis aux examens microscopique, électrophorétique et analyse élémentaire. Ce produit provoque une leucopénie chez les rats albines, ce qui indique une ressemblance probable aux antidotes de l'acide folique. D'autre part, l'observation a montré que ce produit a un effet inhibitif sur la croissance des *Streptococcus faecalis* R. dans des cultures renfermant de l'acide folique à des degrés différents.

Über den Phytoöstrogengehalt einiger Pflanzen

In einer Reihe von Arbeiten wurden in verschiedenen Pflanzen Stoffe nachgewiesen, die bei übermässiger Zufuhr sexuelle Störungen bei weiblichen Tieren hervorrufen können (Robinson[1], Bull[2], Underwood[3], Dohan[4], Chamberlain[5], Schoop und Klette[6]). Die für solche Störungen verantwortlichen sexualaktiven Stoffe nannte Schoop[6] Phytoöstrogene.

Die Mehrheit der erwähnten Autoren nimmt an, dass die Phytoöstrogene die Sterilität der weiblichen Tiere verursachen. Demgegenüber stehen Arbeiten, die zeigen, dass Phytoöstrogene gewisse Funktionen des weiblichen Organismus stimulieren können (Bartlett[7], Cheng *et al.*[8], Bulaševič)[9].

Fasst man die bisherigen Befunde der Phytoöstrogenforschung zusammen (Koller[10], Churý[11]), so kann man sagen, dass das einseitige Betonen der Unfruchtbarkeitswirkung dieser Stoffe auf die geringe Kenntnis der Physiologie der Karenz dieser Stoffe zurückzuführen ist. Nach den Ergebnissen der ausgedehnten Untersuchungen von Schoop und Klette[6] lässt sich eine Arbeitshypothese aufstellen, die besagt, dass die Phytoöstrogene sowohl normale Reservoire sexualaktiver Stoffe wie auch phylogenetisch fixierte Stimulatoren der weiblichen sexuellen Funktionen darstellen. Somit wäre denkbar, dass eine Überdosierung, ebenso aber auch ein Mangel an diesen Stoffen, zu unregelmässiger Sexualtätigkeit der Haustiere führt.

Diese theoretische Annahme über die biologische Bedeutung der Phytoöstrogene weist auf die Wichtigkeit ihrer Erforschung hin.

In unseren bisherigen Versuchen prüften wir den Gehalt dieser Stoffe in Hopfen, Rotklee, Erbsmehl und Kohl: Hopfen soll von den bisher untersuchten Pflanzen die grösste Phytoöstrogenmenge enthalten (Koch und Heim[12]); die Verfütterung von Erbsen führt bei Rattenweibchen zur Sterilität (Sanyal[13]); Rotklee wurde als Phytoöstrogendepot von verschiedenen Autoren beschrieben; Kohl soll nach Rosenberger[14] bei Kühen nebst «Kohlanämie» auch zu sexuellen Störungen führen.

In diesen Pflanzen wurde der Phytoöstrogengehalt an kastrierten Rattenweibchen und infantilen Mäusen bestimmt. Bei den Ratten wurden die Proben intravaginal, bei den Mäusen subkutan oder peroral gegeben. Die Menge der verabreichten Öllösung betrug bei Mäusen 0,01–0,04 ml pro Tag, bei den Ratten 0,02–0,04 ml. Die Öllösungen wurden während 4 Tagen verabreicht. 48 h nach der letzten Injektion wurden die Mäuse getötet und die Uterusgrösse bestimmt. Die Robinsonsche[1] Methodik der Uterusgrössebestimmung haben wir modifiziert: das Herauspräparieren der Uteri wurde erst nach einer 24stündigen Alkohol-Formalin-Fixation vorgenommen. Die Organe wurden mit Filterpapier getrocknet und auf einer Torsionswage gewogen. Bei Ratten wurde die Wirkung mittels Vaginalabstrichen verfolgt.

Der Effekt der so geprüften Öllösungen wurde auch histologisch an Schnitten von Vagina und Uterus verfolgt. Die Empfindlichkeit der Mäuse und Ratten wurde durch Titration mit Östradiolbenzoat ermittelt. Bei Mäusen wurde die Menge der Phytoöstrogene im Material mittels einer Titrationskurve von 0,002–0,012 γ Östradiolbenzoat bestimmt.

Die Extraktion der Phytoöstrogene aus dem Pflanzenmaterial wurde mit kochendem 96% Alkohol 3mal wiederholt und die Extrakte nach Verdampfen durch Ansäuern mit Oxalsäure von Phytin und Chlorophyll befreit. Nach Filtration und Alkalisierung mit *N* NaOH wurde bei 100°C 10 min hydrolysiert, dann mit *N* HCl angesäuert und nachher mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, der Äther abdestilliert und das Residuum in Olivenöl gelöst. Die Menge des Öles wurde so gewählt, dass 1 ml der Öllösung 5–10 g des Pflanzenmaterials entsprach.

In allen von uns untersuchten Pflanzen wurden Phytoöstrogene nachgewiesen (Abb. 1–4). Im Hopfen beträgt die Menge der Phytoöstrogene 1050 bis 2000 γ/kg, im Rotklee 6 bis 9 γ, im Erbsenmehl 4–6 γ und im Kohlkraut 24 γ/kg.

Vergleichen wir unsere Versuchsergebnisse mit den Angaben der Literatur, so finden wir gute Übereinstimmung beim Rotklee; nach Bartlett[8] enthält diese Pflanze 7 γ/kg, nach Cheng[7] 8–16 γ/kg. Beim Hopfen sind unsere Befunde von jenen Kochs und Heims[12] verschieden; sie stimmen jedoch mit der Angabe überein, dass Hopfen die bisher an Phytoöstrogenen reichste Pflanze ist. Betreffend der Befunde beim Kohl konnten wir unsere Befunde nicht vergleichen, weil diese Pflanze bisher auf Phytoöstrogengehalt nicht untersucht wurde. Nach unseren Befunden können nun die älteren Befunde und Angaben Rosenbergers[14] über die Sexualstörungen bei Kühen nach Kohlverfütterung durch die Anwesenheit von Phytoöstrogenen erklärt werden.

Abb. 1: Gebärmutter von Versuchs- und Kontrollmäusen; 1. Maus, mit Hopfenextrakt behandelt; 2. Kontrollmaus, Olivenölbehandlung; 3. Maus mit Östradiolbenzoat behandelt; 3,5fache lineare Vergrösserung

[1] T. J. Robinson, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. *27*, 297 (1949).
[2] L. B. Bull, Austr. vet. J. *27*, 237 (1951).
[3] E. J. Underwood, Austr. vet. J. *27*, 63 (1951).
[4] F. C. Dohan, J. A. V. M. A. *118*, 323 (1951).
[5] B. S. Chaberlain, J. Dept. Agricult. S. Australia *60*, 238 (1957).
[6] G. Schoop, Fortpflanzung und Besamung der Haustiere *2*, 10 (1952); Dtsch. tierärztl. Wschr. *5*, 37 (1955); *5*, 103 (1955); Mh. Tierheilk. *9*, 1 (1957).
[7] S. Bartlett, Nature *162*, 845 (1948).
[8] E. Cheng, J. anim. Sci. *12*, 507 (1953); *12*, 944 (1953).
[9] M. E. Bulaševič, Usp. sovr. biol. *43*, 208 (1957).
[10] R. Koller, Fortpflanzung Zuchthygiene Haustierbesamung *5*, 3 (1955).
[11] J. Churý, Veterinářství *9*, 341 (1958).
[12] W. Koch und G. Heim, Münch. med. Wschr. *95*, 845 (1953).
[13] S. N. Sanyal, Calcutta med. J. *47*, 313 (1950).
[14] H. Rosenberger, Dtsch. tierärztl. Wschr. *51*, 63 (1943).

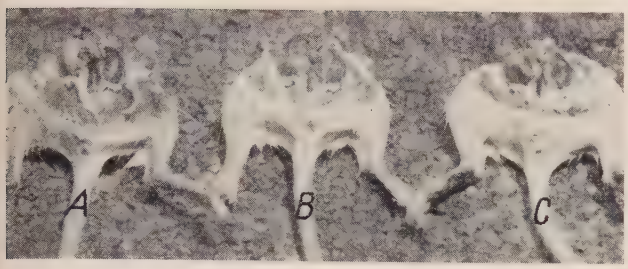


Abb. 2: A. Maus mit Kohlextrakt behandelt; B. Kontrollmaus ohne Behandlung; C. Maus mit Östradiolbenzoat behandelt; 1,5fache lineare Vergrösserung

Abb. 3: Vaginalanstrich einer mit Kohlextrakt behandelten kastrierten Ratte

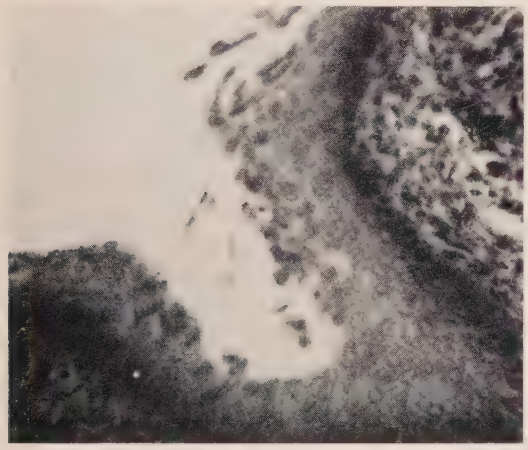


Abb. 4: Vaginalschnitt einer infantilen mit Rotklee-Extrakt behandelten Maus

J. Churý

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Brno (ČSR), 24. August 1959.

Summary

The quantity of phyto-estrogens in red clover, hop, peas, and cabbage was estimated by titration on castrated female rats and infantile mice. The level of phyto-estrogens was as follows: in hop 1050–2000 γ/kg, in peas 4–6 γ/kg, in cabbage 24 γ/kg, and in red clover 6–9 γ/kg. The author supposes that the sexual disorders described by Rosenberger[14] in cows fed with cabbage, can be explained by the presence of phyto-estrogens in this plant.

Notes on the Hydroxamate Assay for Amino Acid Activating Enzymes[1]

The amino acid activating enzymes, first described in mammalian tissues by Hoagland[2] are now quite generally accepted to catalyse the first step in protein synthesis. A worrisome aspect of this concept, however, has been the fact that, while all AA[3] are incorporated into protein, most tissues seem to possess activating enzymes for only a few [4–7]. In some cases, this anomaly seems to be due to a rapid inactivation of some of the enzymes during the extraction and/or purification procedures[8,9], but it now appears that the assays may also be at fault. Webster[10] has discussed reasons for failing to obtain an ATP-PP^{32} exchange with some amino acids; and it is the purpose of the present note to point out some sources of error when the hydroxamate assay is used. In order to obtain meaningful results with the latter, it is essential not only to have a reliable method for the determination of the hydroxamate formed, but also to ascertain that the NH_2OH is not interfering with any of the enzymes, and that the extract used does not destroy the hydroxamate formed or otherwise interfere with its determination.

The Determination of Hydroxamate: For hydroxamates of AA, the method of Schweet[11] is preferable to that of Lipmann and Tuttle[12], which was developed for the determination of acetyl hydroxamate. Instead of strong mineral acid, the former employs concentrated TCA, adjusted to pH 0·9, which is optimum for color development with AA hydroxamates. Under assay conditions, however, when crude extracts are used and in the presence of $NH_2OH \cdot KCl$, the pH (i. e., the empirical reading obtained with a Beckman Model G glass electrode) is often as low as 0·3. Since the color yield in this reaction is inversely proportional to pH between pH 0·3 and 0·9[13] and decreases 20% (0·027 O. D. units at 540 mμ for 1 μM LeuH) for every 0·1 pH unit, very considerable errors in the determination of the AAA-activity are introduced unless the final pH of the reaction mixture (after addition of $FeCl_3$) is taken into consideration.

The Effect of Hydroxylamine on the Assay: It was originally reported by Hoagland[2] that high concentrations of salt-free NH_2OH did not seem to inhibit the AAA-enzymes in liver extract, although $NH_2OH \cdot HCl$ neutralized with NaOH was highly inhibitory. Schweet *et al.*[14], however, found that this inhibition was most likely

[1] This investigation was aided by U. S. Public Health Service Training Grant CRTY-5028.

[2] M. B. Hoagland, Biochim. biophys. Acta *16*, 288 (1955).

[3] The following abbreviations are used throughout: ATP, adenosine triphosphate; AA, amino acid; AAA-enzyme, amino acid activating enzyme; LeuH, leucine hydroxamate.

[4] G. D. Novelli and J. A. DeMoss, J. cell. comp. Physiol. *50*, 173 (1957).

[5] J. W. Davis and G. D. Novelli, Arch. Biochem. Biophys. *75*, 299 (1958).

[6] J. M. Clark, J. biol. Chem. *233*, 421 (1958).

[7] R. D. Cole, J. Coote, and T. S. Work, Nature *179*, 199 (1957).

[8] G. D. Novelli, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *44*, 86 (1958).

[9] B. Nismann, F. H. Bergmann, and P. Berg, Biochim. biophys. Acta *26*, 639 (1957).

[10] G. C. Webster, Arch. Biochem. Biophys. *82*, 125 (1959).

[11] R. S. Schweet, Biochim. biophys. Acta *18*, 566 (1955).

[12] F. Lipmann and C. Tuttle, J. biol. Chem. *159*, 21 (1945).

[13] I. D. Raacke, Biochim. biophys. Acta *27*, 416 (1958).

[14] R. S. Schweet, R. W. Holley, and E. H. Allen, Arch. Biochem. Biophys. *71*, 311 (1957).

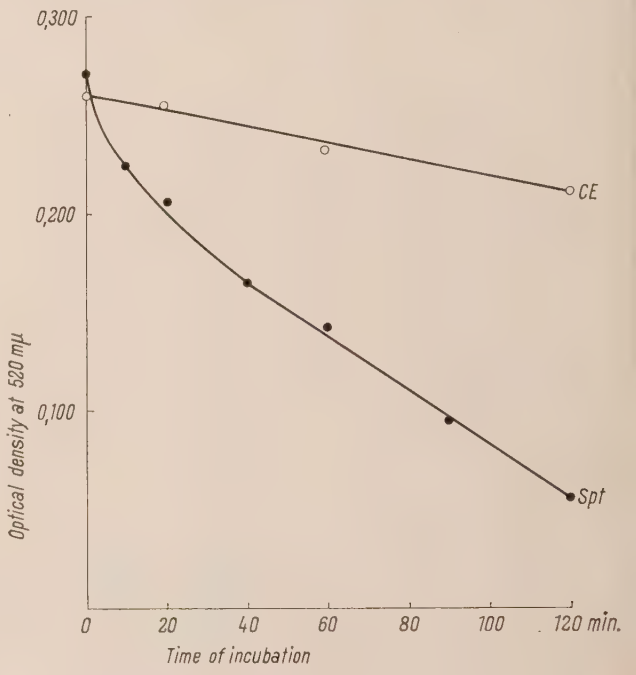
due to the Na^+ (which inhibited the activity of both crude and purified AAA-enzymes) and that if KOH was used for neutralization, the high concentration of K^+ was found to overcome some of the inhibitory effects of Na naturally present in the extracts, and the results were identical or better than those obtained with saltfree NH_2OH. The method had reportedly the further advantage that, contrary to the free base, the hydrochloride was stable and could be stored in the refrigerator, being neutralized just before use. In a recent investigation on the AAA-enzymes in sub-cellular fractions of spinach leaves, Bové and Raacke[15], however, found that over a period of several weeks there was a continuous and drastic decline in the apparent activity of freshly prepared extracts, and more disturbingly yet, there was a gradual increase in the effect of ATP on the amount of hydroxamate formed, both in the presence and in the absence of AA, and a gradual decrease in the amount of AA-dependent hydroxamate. These drifts were eventually found to be correlated with the age of the $NH_2OH \cdot HCl$ (Eastman, sulfate-free) solution. The results obtained with cytoplasmic supernatant (Spt) and chloroplast extract (CE) are shown in the Table. It is seen that whatever the causative agent may be, its concentration in a 21-day old solution of $NH_2OH \cdot HCl$ is sufficient to decrease the apparent activity of CE to one third, but does not yet affect that of Spt. In the light of the different relative behaviour of the two extracts with the same NH_2OH solution, one may wonder about the quantitative significance of the effects obtained even with freshly prepared reagent.

Effect of Age of $NH_2OH \cdot HCl$ Solution on AAA-Assay by the Hydroxamate Method

Fraction	Age of $NH_2OH \cdot HCl$ Days	Specific Activity in μM/mg protein				Percentage increase due to			
		−AA		+AA		ATP		AA	
		−ATP	+ATP	−ATP	+ATP	−AA	+AA	−ATP	+ATP
CE	1	0·15	0·27	1·05	1·05	80	0	600	290
CE	7	0·16	0·26	0·81	1·03	62	27	405	300
CE	21	0·06	0·14	0·19	0·30	140	58	220	107
CE	28	0·05	0·16	0·20	0·39	220	95	300	145
CE	48	0·04	0·12	0·09	0·17	200	90	125	145
CE	52	0·04	0·13	0·08	0·20	225	150	100	54
Spt	1	0·26	0·33	0·91	0·92	21	1	250	180
Spt	21	0·25	0·40	0·91	0·87	60	−5	265	120
Spt	28	0·12	0·23	0·14	0·28	92	100	17	22
Spt	48	0·07	0·13	0·12	0·16	86	72	23	33

For preparation of the extracts see [15]. The incubation mixtures for the assay contained, in a total volume of 3 ml: 100 μM 'Tris', pH 7·5, 15 μM $MgCl_2$, 3000 μM $NH_2OH \cdot KCl$, 5 μM each of Ala, Arg, Asp, Cys, Gly, Glu, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Try, and Val, 2 μM of Tyr, 20 μM ATP and 1 ml of extract

The Interaction of the Extract with the Hydroxamate Formed: Extracts of most tissues will form some hydroxamate without the addition of either ATP or AA. This intrinsic blank is particularly high in plant tissues, and it then becomes important to run internal standards to make sure small amounts of added hydroxamates can be recovered quantitatively. With the system from spinach leaves[15], added LeuH could not be recovered from the Spt under assay conditions. It is now found that even in the absence of added NH_2OH, LeuH is rapidly destroyed by Spt but not by CE, as is seen from the Figure. As a result of this activity (which is heat-labile and presumably enzymic in nature) the apparent concentration of AAA-enzymes in Spt is much reduced. If it turns out that a given tissue extract can destroy different AA hydroxamates at different rates, this might be an important contributing factor towards the inability of demonstrating certain enzymes.



Hydrolysis of Leu Hydroxamate by Spt and CE. The incubation mixtures contained, in a total of 3 ml: 1 ml extract (4·9 mg protein), 100 μM 'Tris' pH 7·5, 10 μM $MgCl_2$, 10 μM ATP, and 2·0 μM LeuH. The incubations were carried out in 20 ml beakers in a Dubnoff metabolic incubator at 25°C. The reaction was stopped by the addition of 1·4 ml of 100% (w/v) TCA. The pH after addition of $FeCl_3$ was 0·3. The O. D. was corrected for a blank of 0·170 given by Spt and $FeCl_3$ alone

I. D. Raacke and J. Bové*

Virus Laboratory, University of California, Berkeley, November 19, 1959.

Zusammenfassung

Die durch die Hydroxamatmethode bestimmte Aktivität von Aminosäureaktivierungsenzymen wird durch das Alter der angewandten $NH_2OH \cdot HCl$-Lösung, durch manchmal vorhandene Hydroxamat spaltende Enzyme sowie durch Unzulänglichkeiten in der chemischen Hydroxamatbestimmungsmethode beeinflusst.

* Permanent address: I. F. A. C., 6, rue du General-Clergerie, Paris (France).

[15] J. Bové and I. D. Raacke, Arch. Biochem. Biophys. *85*, 521 (1959).

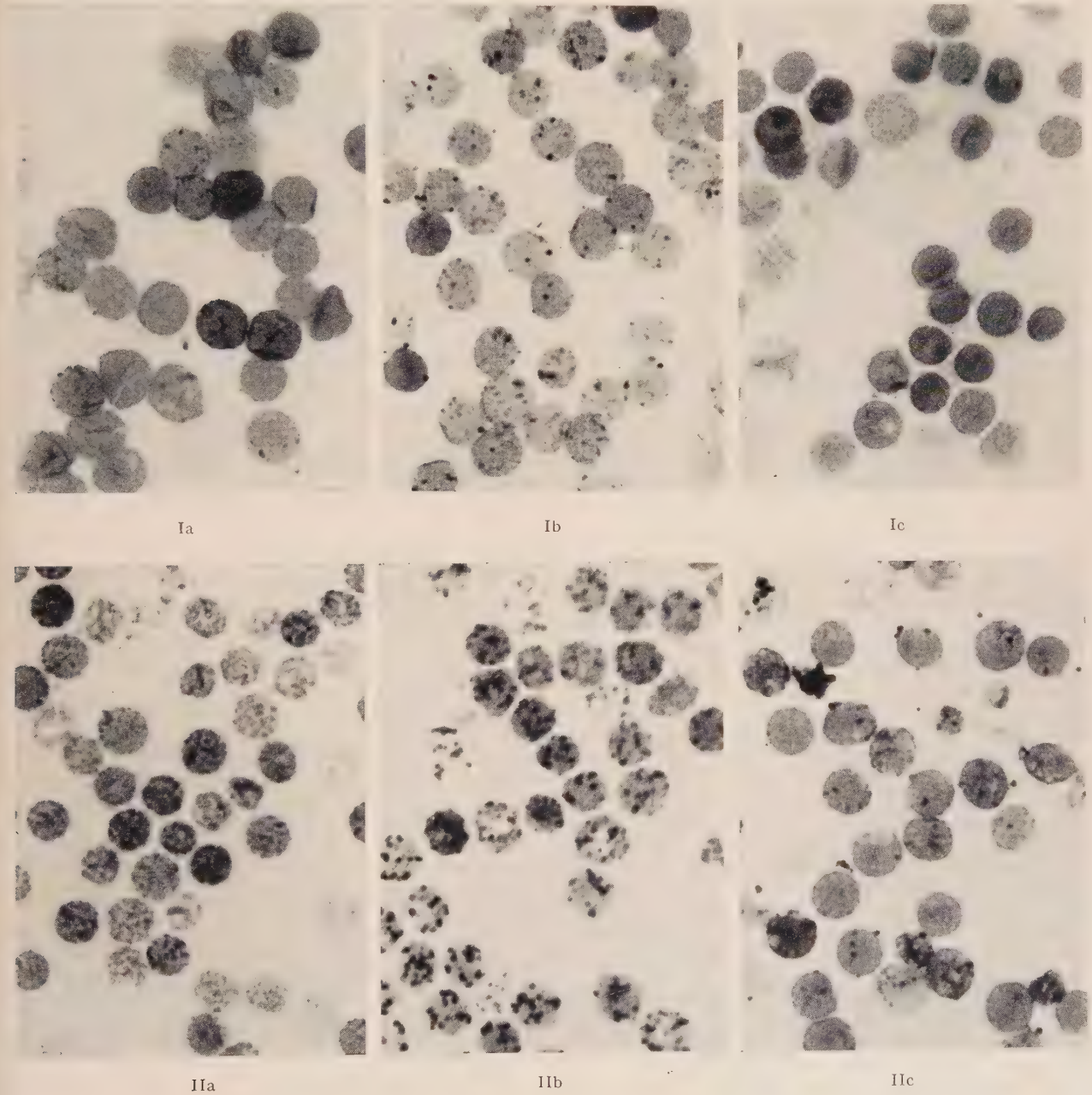
Effect of the Methemoglobinemie on Heinz Body Formation

It has been shown in a previous paper that the methemoglobinemic phase of acute nitrobenzone poisoning precedes the processes founded on peroxidative oxidation (Heinz body and verdoglobin formation)[1]. It seemed possible that it is the methemoglobinemia which inhibits the Heinz body formation. This action of the methemoglobinemia was investigated in an experiment presented in the present paper. Our experimental method was founded on the cyanide-peroxide test[2].

Citrate plasma of 5·0 ml human blood was separated by centrifugation and 15 ml of 2% sodium nitrite was added to the blood cells. After 15 min at room temperature, the red cells were washed with physiological NaCl twice, and after washing were complited with citrate plasma to 5 ml. The control sample was treated with physiological saline instead of nitrite. To 1 — 1 ml treated (methemoglobinemic) and control blood 1 — 1 ml 3×10^{-1}, 3×10^{-2}, and 3×10^{-3} potassium cyanide and after 5 min 1 ml of 1% hydrogen peroxide were added. This was carried at 37°C. Hydrogen peroxide was dissolved in $M/15$ phosphate buffer of pH 7·0. Solutions of lower concentrations prepared from 3×10^{-1} M of KCN were diluted with the same buffer solution.

The number of Heinz bodies in methylviolet preparations (supravital technique) were counted on samples taken after 90 min. It was found at every concentration

[1] L. Magos and M. Sziza, Acta haemat. *22*, 51 (1959).
[2] L. Magos, Exper. *12*, 264 (1956).



Ia Ib Ic

IIa IIb IIc

Heinz bodies produced by cyanide-peroxide test in normal (IIa, IIb, and IIc) and methemoglobinemic red blood cells (Ia, IIb, and IIc)

of KCN that the Heinz body formation was inhibited in red cells containing methemoglobin, as compared with control series. A typical experiment is presented in the Figure.

The question is: how the methemoglobin inhibits the Heinz body formation? The cause of the inhibition may be that the methemoglobin binding all the KCN, the breakdown of hydrogen peroxide is caused by the uninhibited catalase instead of peroxidatic utilization. This possibility was also examined. 0·1 ml KCN-blood mixture was added to 10 ml of $M/60$ phosphate buffer, pH 6·6, and the optical density was determined at 635 mμ before and after adding a drop of neutralised sodium cyanide. There has been no decrease of the optical density in the first (3×10^{-1} M KCN) and in the second sample (3×10^{-2} M KCN). It seems certain that all the ferric ions of the methemoglobin molecules, and likely that all the ferric ions of the catalase molecules, were bound to the cyanide in the second sample and there must be some excess cyanide in the first sample. Another possibility is that the methemoglobin, binding all the hydrogen peroxide, causes a hydrogen peroxide deprivation for the catalase and in this way inhibits the peroxidatic function of catalase.

L. Magos

State Institute of Occupational Medicine, Department of Industrial Hygiene, Budapest, September 1, 1959.

Zusammenfassung

Die methämoglobinisierten (mit Nitrit vorbehandelten) roten Blutkörperchen sind *in vitro* der Heinz'sche Körperchen bildenden Wirkung des Zyanid-Peroxyd-Testes gegenüber resistenter als normale Erythrozyten.

Autoradiographs of Human Sera Tagged with Radioactive Thyroxine and Investigated in Immunoelectrophoresis

The thyroxine circulating in the blood is mainly bound to proteins. It has been found that an α-globulin is likely to be the physiological carrier of the hormone[1–3]. This globulin has been referred to as the thyroxine-binding protein (TBP). If the blood concentration of thyroxine is increased, there is also a loose attachment to the albumin. Titration of the unutilized binding capacity of TBP can therefore be done by adding labelled thyroxine to plasma, using the albumin as a reference[2,3]. Normally, one third of the binding capacity is utilized[4]. Further studies of TBP have revealed that it has a molecular weight of about 50000, an iso-electric point below pH 4·5, and that it seems to be a glycoprotein[5,6]. Since thyroxine is relatively loosely attached even to the TBP, further characterization of the TBP has not been determined.

In contrast with ordinary electrophoretic methods, by means of immunoelectrophoresis[7] it is possible to obtain a closer characterization of precipitating components of, for example, human sera. Therefore, radioactive synthetic thyroxine[8] was added in varying amounts to plasma of a healthy euthyroid adult male. Pairs of samples of the plasma were then separated by means of agar-gel electrophoresis on object slides[9]. One of them was fixed in acetic acid, dried, and autoradiographed. On the other slide, the electrophoretically separated components were allowed to diffuse against a rabbit anti-human serum[7,9,10]. This slide was then dried and autoradiographed. The development revealed arc-shaped lines, the position of which were identical with certain precipitates in the agar-gel (Fig.). Two radioactive spots were obtained in the agar-gel electrophoretic pattern and two distinct arcs appeared in the radioautograph of the other slide when the concentration of the added thyroxine did not exceed 1 μg/ml plasma. The corresponding precipitates have been tentatively characterized as the α_1-glycoprotein[11] and the albumin. A higher concentration of labelled thyroid hormone gave a diffuse pattern in the agar-gel radioautogram but not any new arcs.

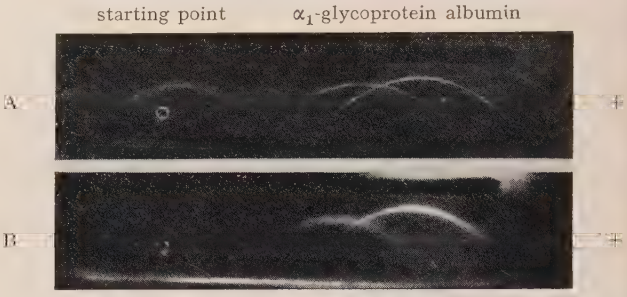


Fig. A: Immuno-electrophoretic pattern of a sample of human plasma to which labelled thyroxine was added (1 μg/ml). Starting point, the position of the α_1-glycoprotein and the albumin precipitates as indicated at the top. Negative pole was on the left, positive on the right. Slight retuch of the α_1-glycoprotein arc. On the original slight at least 14 precipitates were seen

Fig. B: Radioautograph of the plate shown in A. Although the radioactivity of the α_1-glycoprotein precipitate was weaker than that of albumin arc, the specific activity of the former was higher because the glycoprotein was present in the plasma in much lower concentration than the albumin

The finding of distinct radioactive precipitates from plasma to which small amounts of labelled thyroxine had been added, permits the following conclusions. It is highly probable that the TBP is at least partly identical with an α_1-glycoprotein; this is in agreement with previous assumptions in the literature[3,5,6]. We cannot exclude the existence of other TBP components not developed by the immune serum used, but they must occupy closely identical electrophoretic positions. No radioactivity could be

[1] A. H. Gordon, J. Gross, D. O'Connor, and R. Pitt-Rivers, Nature *169*, 19 (1952).

[2] J. Robbins and J. E. Rall, Rec. Progr. Hormone Res. *13*, 161 (1957).

[3] R. Pitt-Rivers and J. R. Tata, *The Thyroid Hormones* (Pergamon Press, London 1959).

[4] E. D. Albright, F. C. Larson, and W. P. Deiss, J. clin. Invest. *34*, 44 (1955).

[5] M. L. Petermann, J. Robbins, and M. G. Hamilton, J. biol. Chem. *208*, 369 (1954).

[6] J. Robbins, M. L. Petermann, and J. E. Rall, J. biol. Chem. *212*, 403 (1955).

[7] P. Grabar, and C. A. Williams, Biochim. biophys. Acta *10*, 193 (1953).

[8] Labelled thyroxine from Amersham, England (I^{131}, approximately 5 mC per mg l-thyroxin; stock solution contains 0·2 mg thyroxin in 50% aqueous propylene glycol).

[9] J. Hirschfeld, Acta path. microbiol. scand. *47*, 160 (1959); *47*, 169 (1959).

[10] J. J. Scheidegger, Int. Arch. Allergy *7*, 103 (1955).

[11] Isolated and described by H. E. Schultze, G. Schwick, I. Göllner, K. Heide, and M. Schönenberger, Z. Naturf. *10 B*, 463 (1955).

demonstrated in the precipitates of the α_1-lipoprotein, α_1-seromucoid, and a component designed as the 'α_1-globulin I' which hitherto are the only components found in the near neighbourhood of the α_1-glycoprotein under the present experimental conditions[12]. It is of interest to note that precipitate formation does take place even in the presence of an excess of thyroxine.

J. Hirschfeld and U. Söderberg

Department of Bacteriology, Karolinska Institute; the State Bacteriological Laboratory; and the Nobel Institute for Neurophysiology, Karolinska Institute, Stockholm (Sweden), November 19, 1959.

Zusammenfassung

Radioautographien menschlichen Plasmas, dem kleine Mengen von radioaktivem Thyroxin zugesetzt worden war, zeigten ein Präzipitat bei der Immunoelektrophorese mit Characteristika, die denen des α_1-Glykoproteins entsprechen. Grosse Mengen des Thyroxins verbanden sich auch mit der Albuminfraktion.

[12] J. Hirschfeld, Acta path. microbiol. scand., in press.

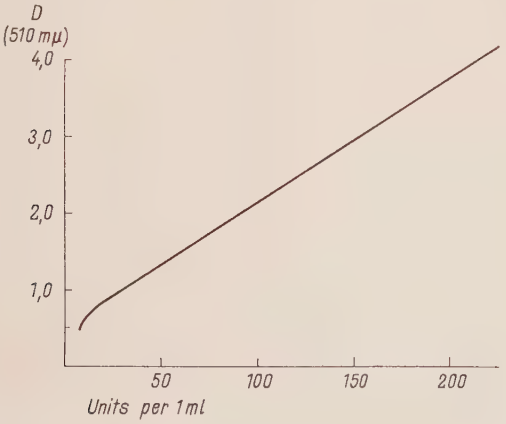
Transaminase in Seminal Plasma of Man

Several enzymes have been detected in the tissues of male accessory organs of reproduction (phosphatases, 5-nucleotidase, ATP-ase, aldolase) (Mann[1]). As far as transaminases are concerned, the prostatic gland and seminal vesicles are shown to be rich in these enzymes (Barron and Huggins[2], Awapara[3]). However, the glutamic oxaloacetic transaminase (GO-T) has not yet been reported in the whole semen or in the seminal plasma.

Studying the GO-T activity of several human secretions and body fluids, we were impressed by the high values obtained in seminal plasma (Povoa and Villela[4]).

The high content of certain free amino acids and of citric acid in this fluid is possibly due to the transamination of glutamic acid and production of oxaloacetic acid. Awapara[3] pointed out that, in the prostatic gland, transamination is the only way of desamination.

Materials and methods: The GO-T was determined by an adaptation of the method of Reitman and Frankel[5] used for blood serum. A calibration curve was constructed



according to these authors, employing 0·05 ml instead of 0·2 ml. The readings in optical densities at 510 mμ were plotted against units per 1 ml of seminal plasma as seen in the Figure.

Whole semen was centrifuged and the clear seminal plasma pipetted off. All the semens were previously submitted to standard tests so as to establish a criterium for normality (volume, shape, number, vitality, and motility of the spermatozoa).

Plasma in the volume of 0·05 ml was incubated 60 min at 37°C with 0·5 ml of the substrate (aspartate -α-ketoglutarate, pH 7·5) added with 0·5 ml of 2,4-dinitrophenylhydrazine hydrochloride 10^{-3} *M* and the colour developed after 20 min by adding 5 ml of 0·4 *N* NaOH. The optical density was read at 510 mμ in a spectrophotometer after 30 min against a blank. The values using this method are in accordance with those obtained with the method of Karmen, Wroblewski, and LaDue[6].

Results: The results obtained with the seminal plasma of normal, oligospermic, and azoospermic cases are presented in the Table.

Human seminal plasma Glutamic-oxaloacetic transaminase

Condition	No. of cases	No. spermatozoa 10^6/1ml	GO-T [a] Range	GO-T [a] Average and S.D.	t	P
Normal . . .	10	41–131	150–600	365 ± 170	—	—
Oligospermia	10	2–25	130 460	271 ± 110	1·4	<0·05 0·1
Azospermia .	5	0	80–260	172 ± 78	3·0	<0·01

[a] Values expressed in Reitman-Frankel units/ml

Normal seminal plasma showed values (average 365 ± 170 units) twenty times the normal blood serum (average 18 units). A marked decrease was observed in oligospermia and chiefly in azoospermia. The decrease for azoospermia was statistically significant ($t = 3{\cdot}0$; $P < 0{\cdot}01$) and for oligospermia less significant ($P < 0{\cdot}1$).

Since the enzyme activity is still elevated in the absence of spermatozoa, it seems that the conditions of the prostatic and seminal glands must be responsible for the low values found.

H. Povoa, Jr. and G. G. Villela

Biochemical Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (Brazil), October 9, 1959.

Résumé

La transaminase glutamo-oxaloacetique (GO-T) a été déterminée dans le liquide spermatique de l'homme après la séparation des spermatozoïdes. On a trouvé des valeurs élevées pour la GO-T dans le sperme normal et une diminution accentuée dans les cas d'oligospermie et surtout d'azoospermie. Les conditions de la prostate et des vésicules séminales semblent être responsables de cet abaissement de l'activité enzymatique puisque le liquide sans spermatozoïdes (azoospermie) présente encore une activité bien marquée.

[1] T. Mann, *Biochemistry of Semen* (Methuen and Co., London 1954).
[2] E. S. G. Barron and C. Huggins, J. Urol. *55*, 385 (1946).
[3] J. Awapara, Endocrinology *51*, 75 (1952).
[4] H. Povoa, Jr. and G. G. Villela, Abstracts and Communications, XXI International Congress of Physiology, Buenos Aires, 219 (1959).
[5] S. Reitman and S. Frankel, Amer. J. clin. Path. *28*, 56 (1957).
[6] A. Karmen, F. Wróblewski, and J. S. LaDue, J. clin. Invest. *34*, 126 (1955).

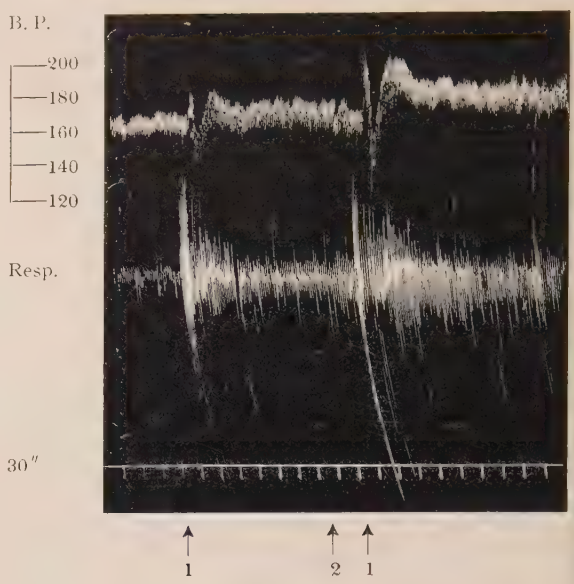
Some Biological Properties of two Fluoro-Derivatives of Tryptamine

In the present communication some biological properties of two fluoro-derivatives of tryptamine, namely 5-fluorotryptamine hydrochloride and 4-fluoro-7-methyltryptamine, are described[1]. It is shown that they closely resemble the parent compound, tryptamine, in many respects. A similar parallelism between certain derivatives of tryptamine and tryptamine itself has been reported recently by Vane[2].

Methods: The following substances were used: 5-fluorotryptamine hydrochloride (5-FT)[3], 4-fluoro-7-methyltryptamine (4F-7M), tryptamine hydrochloride (T), and 5-hydroxytryptamine creatinine sulphate (5-HT).

The toxicity of the first three was tested on male white mice of 20 g body weight, when injected subcutaneously. Dilutions were made in saline, 4F-7M being neutralised in advance by an equimolar amount of hydrochloric acid. The LD_{50} was determined by the log probit method[4]. All quantities are given in terms of the free base. Dogs, mongrels of both sexes (22 animals), were anesthetised with chloralose. The blood pressure was recorded from the right carotid artery with a mercury manometer, and the respiration by a rubber pneumograph. Injections were made through a metallic cannula placed in the jugular vein. To test the central effects in the unanesthetised animal, a permanent cannula was placed in the lateral ventricle of 10 dogs according to the method of Haley and Dickinson[5], and mice were injected intracerebrally using the technique of Haley and McCormick[6]. A maximum volume of 0·5 ml was introduced into the dogs and 0·05 ml into the mice.

Results: The LD_{50} in mice, by the subcutaneous route, was found to be 439 mg/kg for 5-FT, 320 mg/kg for 4F-7M, and 504 mg/kg for T. The symptoms of poisoning with lethal doses were piloerection, obnubilation, lachrimation, bradypnoea with cyanotic tongue, and strong convulsions. Death took place in 2 min to several h after administration. A dose of 320 μg of 5-FT or 4F-7M invariably caused a slight transient hypotensive response in the chloralosed dog and had little effect on the respiration. The protean character of the blood pressure responses to 5-HT in the anesthetised dog (Page[7] Erspamer[8]) was also seen in our experiments, and when 5-FT or 4F-7M was injected shortly before 5-HT, they always potentiated the latter's response (Fig.). Besides this, 5-FT lowered the rate of disappearance of 5-HT in *in vitro* experiments, using monoamine oxidase of guinea pig liver mitochondria[9]. A similar synergistic effect of 5-FT towards 5-HT has been observed by Quadbeck and Roehm[10] on the isolated guinea pig intestine. The intracerebral injection of 250 μg of 5-FT into mice immediately produced a stuporous state, similar to that observed by Haley[11,12] after the injection of smaller doses (10–30 μg) of 5-HT. After the intraventricular injection into dogs of 800 μg/kg T, 1 mg/kg 5-FT or 2 mg/kg 4F-7M, the animal fell into a catatonic-like state similar to that observed by Sacchi *et al.*[13] after the injection of 5-HT via the cisterna magna into dogs, and these results were confirmed by us using the intraventricular cannula. It was of interest to observe the loss of muscular tone which permitted the placing of the dog into abnormal positions, as also seen in the cat by Feldberg and Sherwood[14], Gaddum and Vogt[15], but not by Bradley[16]. T also caused defecation of fluid stools, strong rectal tenesmus, and salivation.



Effects of 5-HT and 5-FT on blood pressure and respiration in the chloralosed dog (♂ 11·5 kg)
At 1: 172 μg 5-HT At 2: 320 μg 5-FT

Conclusion: The two fluoro-derivatives of tryptamine studied appear to be more toxic than tryptamine itself. Whilst they themselves, in the doses considered, have only a slight effect on the blood pressure and respiration of the dog, they synergise the responses obtained with 5-HF when injected shortly before this substance, perhaps by preventing the rapid oxidation of 5-HT as seen in *in vitro* experiments. T, 5-FT and 4F-7M are able to produce central effects, when injected intracerebrally, similar to those of 5-HT, but only in larger doses.

H. Edery and G. Schatzberg-Porath

Israel Institute for Biological Research, Ness-Ziona (Israel), September 11, 1959.

Résumé

La toxicité de la fluoro-5-tryptamine et de la fluoro-4-méthyl-7-tryptamine, ses effets centraux et son influence sur la pression artérielle et la respiration ont été étudiés sur les chiens et souris.

[1] We wish to thank Dr. Z. Pelchowicz for supplying these substances.

[2] J. R. Vane, Brit. J. Pharmacol. *14*, 87 (1959).

[3] Z. Pelchowicz and E. D. Bergmann, J. chem. Soc. *1959*, 847.

[4] D. J. Finney, *Probit Analysis* University Press, Cambridge, 1952).

[5] T. J. Haley and R. W. Dickinson, J. Amer. Pharm. Ass. (Sci. Ed.) *45*, 432 (1956).

[6] T. J. Haley and W. G. McCormick, Brit. J. Pharmacol. *12*, 12 (1957).

[7] I. H. Page, *5-Hydroxytryptamine* (Pergamon Press 1958), p. 93.

[8] V. Erspamer, A. M. A. Arch. int. Med. *90*, 505 (1952).

[9] A. Chari-Bitron, unpublished results.

[10] G. Quadbeck and E. Roehm, Z. physiol. Chem. *297*, 229 (1954).

[11] T. J. Haley, Acta pharmacol. toxicol. *13*, 107 (1957).

[12] T. J. Haley, J. Amer. Pharm. Ass. (Sci. Ed) *46*, 428 (1957).

[13] U. Sacchi, L. Garello, G. Dolce, and F. Banamini, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *32*, 179 (1956).

[14] W. Feldberg and S. L. Sherwood, J. Physiol. *123*, 148 (1954).

[15] G. H. Gaddum and M. Vogt, Brit. J. Pharmacol. *11*, 175 (1956).

[16] P. B. Bradley, *5-Hydroxytryptamine* (Pergamon Press 1958), p. 214.

Immunologische Eigenschaften der menschlichen mit Heparin präzipitierten Plasmafraktion

Arbeiten der letzten Jahre betonten die Rolle des Fibrinogens in der Pathogenese des Fibrinoids, welches nach immunochemischen Arbeiten[1,2] neben anderen Komponenten auch Fibrin enthält. THOMAS *et al.*[3] beobachteten bei der experimentellen Shwartzmanschen Reaktion nach Heparinzusatz und Abkühlung des Kaninchenblutes die Entstehung eines besonderen Präzipitats, einer Plasmafraktion (HPF), die auch bei manchen entzündlichen und nekrotisierenden Prozessen beobachtet wurde[4,5]. Sie ist in löslicher Form im dekalzifizierten Plasma vorhanden. Nach Zugabe einer gewissen Heparinmenge sowie ähnlicher Substanzen kommt es zur Herabsetzung ihrer Löslichkeit, diese wird ebenfalls beeinflusst durch Temperatur, ionale Verhältnisse und pH[4]. Papierelektrophoretisch zeigt die zum Teil mit Thrombin gerinnbare Fraktion dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie das Fibrinogen. In einigen Eigenschaften ist sie dem Morrisonschen «Kontraktinogen»[6], dem «Fibrinogen B»[7] und dem «Kryofibrinogen»[8] vergleichbar. THOMAS *et al.*[3] wiesen auf eine mögliche Funktion der HPF als Fibrinoidprekursor hin.

Die vorliegende Arbeit untersucht die immunologischen Eigenschaften der HPF.

Methodik: Herstellung der HPF: Plasma von 6 Kranken (mit Lymphogranulomatose, maligner Retikulose, Phlebothrombose), mit 500 Heparineinheiten pro 5 ml Blut, wurde auf 3–4°C abgekühlt. Der so entstandene Niederschlag wurde mehrfach mit kaltem 0,15 *M* NaCl und 0,05 *M* Phosphatpuffer von pH 7,4 gewaschen.

Die Papierelektrophorese wurde in Veronalpuffer von pH 8,6 (Ionenstärke 0,05) durchgeführt.

Die Antiseren: Das spezifische Antiserum wurde durch obligate intravenöse Immunisierung der Kaninchen mit HPF (Gesamtmenge von ca. 270 mg des gerinnbaren Anteils der HPF) hergestellt. Elf Tage nach der letzten Injektion wurde das Kaninchenblut in 3,8% Trinatriumzitrat (1:10) aufgenommen. Das so gewonnene Plasma wurde durch Zugabe der minimalen Menge von gereinigtem Thrombin defibriniert.

Immunologische Methoden: Die Ringpräzipitationsmethode, die Oudinsche Agar-Gel-Diffusionsmethode[9] und die Doppeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY[10] wurden benutzt. Sämtliche Agarbasen, die Merthiolat im Verhältnis von $1:10^{-4}$ enthielten, wurden mit Veronalpuffer von pH 7,4 verdünnt. Antiseren und Antigene wurden in 0,05 *M* NaCl und 3,8%iger Trinatriumzitratlösung verdünnt.

Ergebnisse: Sämtliche lösbaren HPF zeigten bei der Papierelektrophorese dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie das Fibrinogen (Abb. 1). Bei der Ringpräzipitation wurde mit den absorbierten Anti-HPF-Seren und dem homologen Antigen eine positive Präzipitation bis zur Verdünnung von 1:128 und mit dem Fibrinogen der Cohnschen Fraktion I im Verhältnis von 1:32 bis 1:64 erzielt. Auch die anderen isolierten HPF zeigten eine positive Präzipitation. Bei der einfachen Agar-Gel-Diffusion beobachteten wir die Entstehung von mindestens 8 Präzipitationslinien, falls gereinigte HPF und nicht absorbiertes Antiserum benutzt wurden. Nach der Absorption des Antiserums entstanden jeweils eine stärkere und 2 schwächere Zonen. Die Diffusion bei niedriger Temperatur (3–4°C) liess unter Verwendung desselben Antiserums und der homologen HPF nur 2 Linien erkennen. Bei der Doppeldiffusion wurde die Entstehung von mindestens 3 Zonen beobachtet (Abb. 2). Eine der Zonen war mit der Linie des mit Thrombin präzipitierten Anteils der Cohnschen Fraktion I und des gereinigten Fibrinogens der Cohnschen Fraktion I identisch. Nach Zugabe von Thrombin zur gelösten HPF trat sie nach Beseitigung des Niederschlags nicht mehr in Erscheinung. Die Zone, welche dem Fibrinogen entsprach[11,12], fehlte auch nach Erhitzen

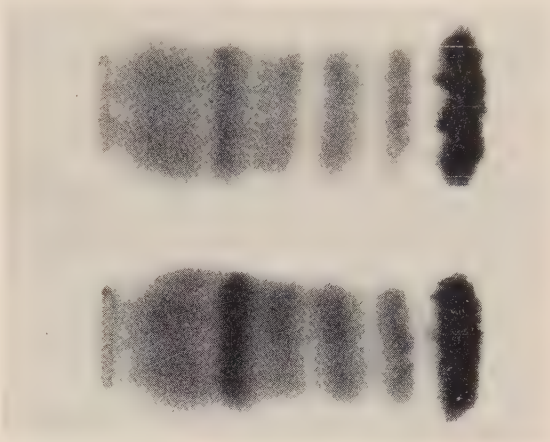


Abb. 1: Elfo; oben: Zitratplasma ohne Zusatz von HPF
unten: Zitratplasma nach Zusatz von HPF

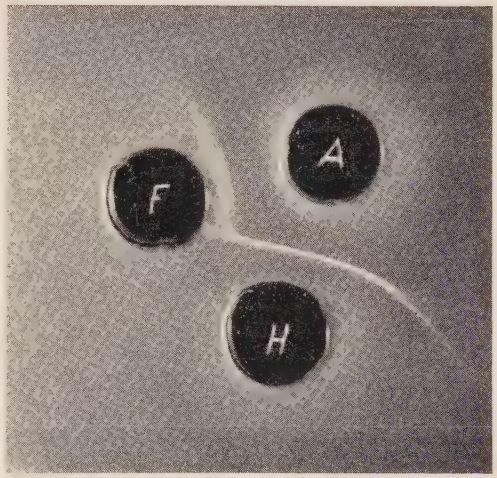


Abb. 2: H: Die mit Heparin präzipitierte Plasmafraktion
F: Fraktion I nach COHN A: Anti-HPF-Serum

[1] R. MELLORS und L. ORTEGA, Amer. J. Path. *32*, 455 (1956).
[2] D. GITLIN, J. CRAIG und C. JANEWAY, Amer. J. clin. Path. *33*, 55 (1957).
[3] L. THOMAS, R. SMITH und R. v. KORFF, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *86*, 813 (1954).
[4] R. SMITH und R. v. KORFF, J. clin. Invest. *36*, 596 (1958).
[5] G. SICCA und N. DEL BONO, Arch. Maragliano *13*, 1189 (1957).
[6] J. MORRISON, Amer. J. med. Sci. *211*, 325 (1946).
[7] B. LYONS, Nature *155*, 633 (1945).
[8] D. KORST und C. KRATOCHVIL, Blood *10*, 945 (1955).
[9] J. OUDIN, Ann. Inst. Past. *75*, 309 (1948).
[10] O. OUCHTERLONY, Ark. Kemi Miner. Geol. [B] *26*, 14 (1948).
[11] M. SEŁIGMAN, B. GOUDEMAND, A. JANIN, J. BERNARD und P. GRABAR, Rev. Hématol. *12*, 302 (1957).
[12] J. SALMON und Y. BOUNAMEAUX, Thromb. Diat. Haem. *2*, 2 (1958).

der HPF während 3 min auf 56°C. Die zweite Linie, welche stets bei den Diffusionsversuchen mit HPF vorhanden war und welche nach Sättigung des Antiserums mit γ-Globulin verschwand, war mit der Linie des zu Vergleichszwecken zugesetzten γ-Globulins identisch. Beim Vergleich der einzelnen HPF in Kreuzversuchen konnten wir keine besondere abweichende Komponente nachweisen (Abb. 3). Das Anti-HPF-Serum übte keinen Einfluss auf die Konversion des plasmatischen Prothrombins aus. Nach seinem Zusatz zur gelösten HPF und in Anwesenheit des Thrombins trat eine faserige Masse in Erscheinung, die sich unter gleichen Bedingungen von dem gelatinösen Präzipitat bei Benutzung der Cohnschen Fraktion I unterschied.

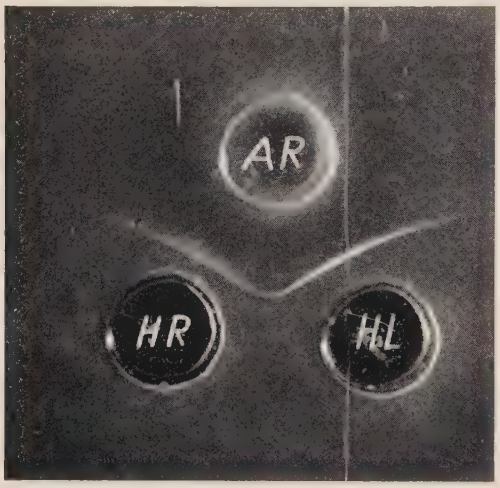


Abb. 3: HR-HPF eines Kranken mit maligner Retikulose
HL-HPF eines Kranken mit Lymfogranulomatose
AR-Anti-HPFR-Serum

Diskussion: Die gewonnenen plasmatischen Kryopräzipitate waren alle bei 37°C in 0,15 *M* NaCl gut lösbar. Sie waren alle teilweise mit Thrombin gerinnbar. Der ungerinnbare Anteil konnte durch intensive Waschung nicht mehr weiter herabgesetzt werden. Die nach Zugabe von Thrombin und Ca'' gewonnenen Polymeren zeigten einen bestimmten gegenseitigen Unterschied ihrer Lösungsfähigkeit in verdünnter Schwefelsäure und 30%igem Harnstoff[13]. Die bereits früher erwähnten Eigenschaften (ähnliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten wie das Fibrinogen, teilweise Gerinnbarkeit mit Thrombin), ferner der Umstand, dass das HPF nach Abkühlung von Heparinplasma und nicht nach Abkühlung des Serums mit oder ohne Heparinzusatz entsteht, weisen auf die Verwandtschaft mit Fibrinogen hin. Die durch Immunisation der Kaninchen mit plasmatischen Kryopräzipitaten gewonnenen Antiseren gaben Präzipitationslinien sowohl mit der HPF als auch mit dem Fibrinogen der Cohnschen Fraktion I. Eine der Präzipitationslinien war bei Verwendung der Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony mit der Linie des gereinigten Fibrinogens der Cohnschen Fraktion I identisch. Sie trat jedoch nach Erhitzen des Antigens (HPF) (3 min auf 56°C), nach Fällung der HPF mit Thrombin und auch nach Absättigung des Antiserums mit dem Fibrinogen nicht mehr in Erscheinung. Daraus wird geschlossen, dass die HPF eine mit dem Fibrinogen immunologisch identische Komponente neben einer γ-Globulin-Komponente, deren Präzipitationslinie nach völliger Absättigung des Antiserums mit γ-Globulin verschwand, enthält. In den Kreuzversuchen mit Anti-HPF-Seren und homologen und heterologen HPF ist in keinem Fall das Entstehen einer atypischen Präzipitationslinie, deren Gegenwart auf die individuelle Spezifität der HPF und dadurch auf den Paraproteincharakter der HPF im strengen Sinne des Wortes hinweisen würde, beobachtet worden. Dies wird auch durch den Umstand bekräftigt, dass bei den elektrophoretischen Untersuchungen der Seren der untersuchten Patienten keine einem Paraprotein ähnliche Komponente aufgefunden werden konnte.

K. Barta und A. Bartova

I. Medizinische Klinik der Palacky Universität, Olomouc (Tschechoslowakei), 17. August 1959.

Summary

The plasmatic fraction, which is precipitated by cooling human heparin plasma, has been found to contain the constituent identical with γ-globulin and also another component with the fibrinogen of Cohns' fraction I immunologically identical. With the help of the agar-gelose diffusion method, no qualitative immunological differences have been found with regard to the antigenous composition of the plasmatic fraction isolated in cases of various system diseases.

[13] K. Bárta, Acta univ. Palack (im Druck).

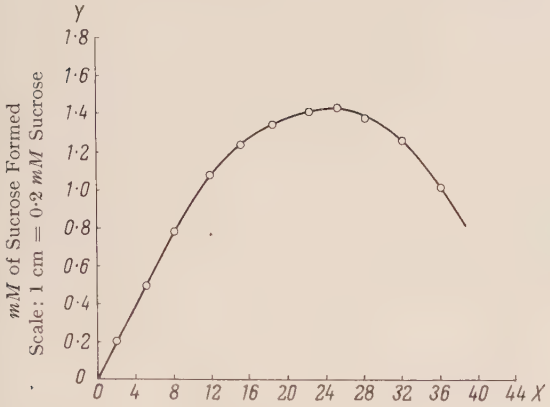
Studies on Biosynthesis of Sucrose

The authors have already reported[1] the presence of sucrose phosphorylase in sugar cane juice. The sucrose phosphorylase isolated by the authors is similar to that isolated by Hassid and Doudoroff[2] only in so far as it is not inhibited by NaF. It has not been reported as yet how the sucrose phosphorylase from the cane juice differs from the enzymes reported earlier in *Pseudomonas saccharophilia*[2], wheat germ extract[3,4], and pea extract[5]. In this communication, a study of the kinetics of the enzyme has been incorporated to indicate that the sucrose phosphorylase isolated from cane juice differs markedly from the enzyme reported earlier.

It has been found that the enzyme is stable towards dialysis against citrate, veronal acetate and phosphate buffers at pH 6·6 and 5°C. Dialysis towards distilled or tap water up to 72 h at 5°C did not reduce the enzyme activity to any appreciable extent. This is in contrast to the enzyme from *Pseudomonas*[2] and pea extract[5].

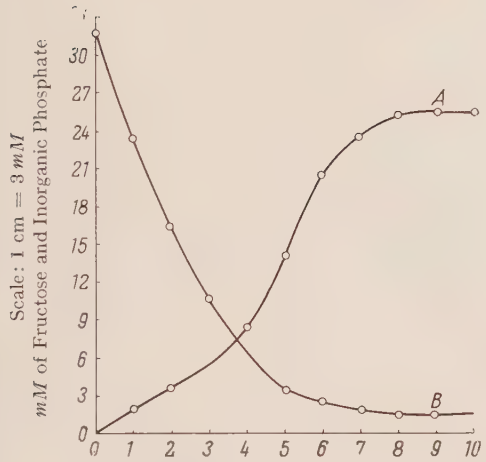
Repeated precipitation with ammonium sulphate and dialysis against tap or distilled water did not injure the enzyme activity, proving thereby that no other coenzyme is associated with sucrose phosphorylase to carry out the sucrose synthesis reaction in the sugarcane plant. No

[1] J. P. Shukla and K. A. Prabhu, Naturwissenschaften, in press.
[2] M. Doudoroff, N. Kaplan, and W. Z. Hassid, J. biol. Chem. *148*, 67 (1943).
[3] L. F. Leloir and C. E. Cardini, J. Amer. chem. Soc. *75*, 6084 (1953).
[4] L. F. Leloir and C. E. Cardini, J. biol. Chem. *214*, 149 (1955).
[5] J. F. Turner, Nature *172*, 1149 (1953).



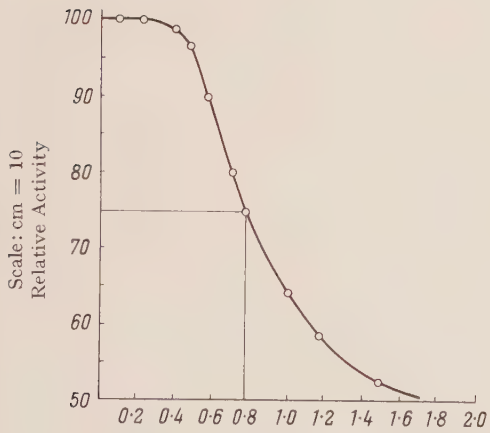
OX *mM* of G-1-P
OY *mM* of Sucrose Formed.

Fig. 1



A = Phosphorus B = Frutose
Time in hours Scale: 1 cm = 1/2 h

Fig. 2



– Log [S]
Scale: 1 cm = 0·2 km = $1{\cdot}66 \times 10^{-1}$

Fig. 3

priming agent is needed for the enzyme and it is destroyed by heating to 50°C for 10–15 min. The enzyme is stable at 5°C and can be preserved at this temperature for sixty days. The optimum for enzyme action lies at 6·6 pH. The temperature factor Q 10 is nearly 2, and the rate of esterification is proportional to the amount of the enzyme preparation.

In the enzyme reaction G-1-P + Fructose $\rightleftarrows$ sucrose + inorganic phosphate, increasing the G-1-P concentration and keeping fructose concentration at 4·3 *mM*, the sucrose formation was increased; whilst on increasing the fructose concentration, no optimum was observed. Figure 1 shows the optimum for G-1-P Conc. to be 25·2 *mM*. Liberation of phosphorus from G-1-P takes place only after addition of fructose.

Equilibrium constant was determined by incubating a potent enzyme preparation with G-1-P + fructose at 6·6 pH and 35°C until there was no further change in phosphorus and sugar. The reaction was followed as shown in Figure 2 by the estimation of rise in inorganic phosphorus liberated and fall in reducing sugar, according to Fiske and Subbarow[6], and Somogyi[7] respectively. Time taken was 6–8 h.

Equilibrium constant $K_e = 5{\cdot}6$ at 35°C and 6·6 pH.

Free energy $F_0 = -1053$.

The activity of the enzyme increases with an increase in sucrose concentration (esterification). The Michaelis constant was determined by plotting $-\log M_{suc}$ against relative activity of the enzyme. A «S» shaped curve is obtained as shown in Figure 3.

Michaelis constant K_m is $1{\cdot}66 \times 10^{-1}$.

The main differences in the sucrose phosphorylase from cane juice as against others lie in its behaviour towards dialysis against water[5], in its equilibrium constant, which in this case is 5·6 as against 0·058 in *Pseudomonas saccharophilia*[2], in the Michaelis constant, which is $1{\cdot}66 \times 10^{-1}$ as against $2{\cdot}3 \times 10^{-3}$ in wheat germ enzyme[4], and in the optimum for G-1-P which is 25·2 *mM* as against 30·0 *mM* as observed in pea extract[8].

The authors' thanks are due to Shri S. N. Gundu Rao, B. Sc., A.H.B.T.I., F.R.I.C., Director, National Sugar Institute for taking keen interest in the work.

J. P. Shukla and K. A. Prabhu

National Sugar Institute, Kanpur (India), May 25, 1959.

Résumé

Du jus de canne à sucre, les auteurs ont extrait un enzyme, le sucrose phosphorylase, qui diffère des enzymes tirés jusqu'ici de *Pseudomonas saccharophilia* par certaines propriétés caractéristiques. La présente note étudie ces propriétés et donne la détermination de leurs constantes physiques.

[6] C. H. Fiske and Y. Subbarow, J. biol. Chem. *66*, 375 (1925).
[7] M. Somogyi, J. biol. Chem. *160*, 61 (1945).
[8] J. F. Turner, Biochem. J. *67*, 450 (1957).

Die Wirkung des Hydrocortisons auf die infektionsbedingte lokale Leukozytenansammlung

In zahlreichen Arbeiten wird beschrieben, dass Corticosteroide vom Cortisontypus in hoher Dosierung, namentlich bei wiederholter Gabe, die Resistenz des Tieres gegenüber einer experimentellen Infektion herabsetzen (zum Beispiel Thomas[1], Furness[2], Ducommun und Ducommun[3]). Unter anderen Dosis- und Zeitbedingungen kann jedoch auch eine Schutzwirkung gegenüber dem tödlichen Effekt der Infektion erzielt werden (Robinson und Smith[4], Chedid und Boyer[5]). Wir haben in früheren Arbeiten derartige Befunde bestätigt[6,7].

Trotzdem verschiedene Effekte des Cortisons Erklärungsmöglichkeiten für diese Wirkungen auf den Infektionsablauf bieten, ist es nicht möglich, einen derselben als in besonderem Masse für die Herabsetzung der Resistenz verantwortlich in Anspruch zu nehmen. Es kommen die Wirkungen auf die Permeabilität des Gewebes, die Lymphozytolyse, die Herabsetzung der Antikörperbildung, die Hemmung von Leukozytenfunktionen wie Phagozytose, die Hemmung des RES usw. in Frage. Kürzlich haben wir beschrieben, dass die Infektionsresistenz in quantitativer Beziehung zu der von dem Infektionserreger bzw. seinen Produkten ausgelösten lokalen Leukozytenreaktion steht[8,9]. Vorbehandlung mit bakteriellen Lipopolysacchariden verstärkt diese in charakteristischer Weise und erhöht gleichzeitig die Resistenz gegenüber der Infektion.

Da die von uns für Untersuchungen an der Maus ausgearbeitete Methode quantitative Werte der Leukozytenreaktion ergibt, war es naheliegend zu untersuchen, ob Cortisonstoffe einen Einfluss auf die durch Infektionserreger bzw. deren Produkte ausgelöste lokale Leukozytenreaktion besitzen und ob dieser zur Infektionsresistenz in Beziehung gesetzt werden kann. Es wurden zu diesem Zweck Versuche durchgeführt, bei denen einerseits Mäuse eine subkutane Hydrocortisondosis (mit etwas Methylzellulose in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert) erhielten und gleichzeitig mit einer subletalen Dosis von *E. coli* intraperitoneal infiziert wurden (Abb. 1), andererseits Mäuse 5 Tage lang mit Hydrocortison vorbehandelt wurden und zusammen mit der letzten Hormondosis eine lipopolysaccharidhaltige Proteusfraktion intraperitoneal injiziert erhielten (Abb. 2).

Das Ergebnis war eindeutig. Bei genügend grosser Dosierung kommt es zu einem dosisabhängigen Absinken der Leukozytenreaktion, bei höchsten Dosen ist die lokale Leukozytenansammlung vollständig gehemmt. Parallel dazu kommt es zu einer Zunahme der Anfälligkeit der Tiere gegenüber dem letalen Effekt der Infektion. Wir haben zahlreiche Anhaltspunkte dafür, dass schon wesentlich geringere Hydrocortisondosen zu dieser Leukozytenhemmung mit paralleler Infektionsverschlimmerung führen, dass aber im Bereich mittlerer Konzentrationen nochmals ein Anstieg der Kurve mit entsprechendem Anstieg der Überlebensrate eintritt. Dieser Befund kann statistisch noch nicht als absolut gesichert angesehen werden. Entspricht er wirklich einem tatsächlichen Vorgang, so wäre er ein weiterer Beweis dafür, dass bei der Variation der Infektionsresistenz durch Hydrocortison mehrere Faktoren bestimmen, ob schliesslich die Infektionsresistenz herabgesetzt oder erhöht wird.

Die durch die Proteusfraktion ausgelöste Leukozytenreaktion wird in gleicher Weise wie die durch lebende Bakterien ausgelöste durch Hydrocortison gehemmt. Da anzunehmen ist, dass in beiden Fällen Lipopolysaccharide

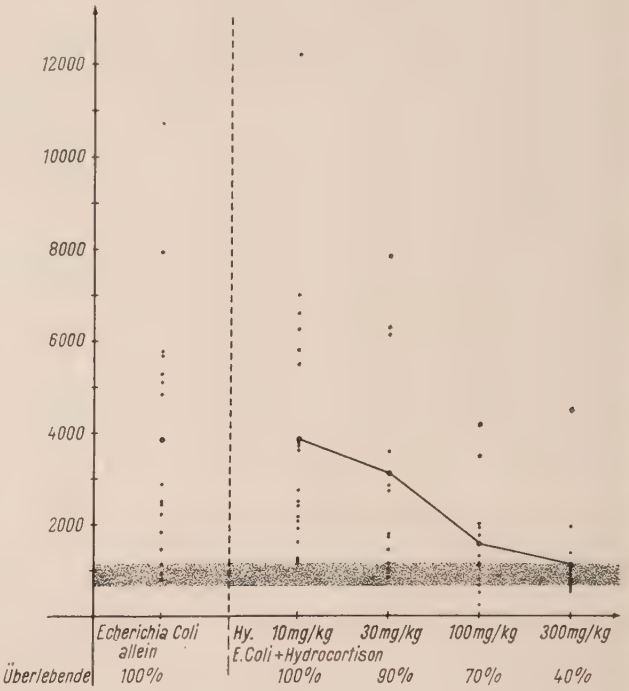


Abb. 1: Wirkung von Hydrocortison auf die durch lebende Colibakterien ausgelöste lokale Leukozytenreaktion. – Abszisse: Hydrocortisondosen. – Ordinate: Anzahl Leukozyten pro mm³ aufgefangener Spülflüssigkeit. Grau hervorgehobener Bereich der Normalwerte. Infektionsdosis: 24 h-Kultur, verdünnt 1:300 mit physiologischer Kochsalzlösung, 0,2 ml intraperitoneal. Untersuchung 16–20 h nach der Infektion. Am Fuss der Abbildung sind die Prozentsätze der nach 10 Tagen überlebenden Tiere angegeben (ermittelt aus Parallelversuchen mit je 10 Mäusen/Hydrocortisondosis)

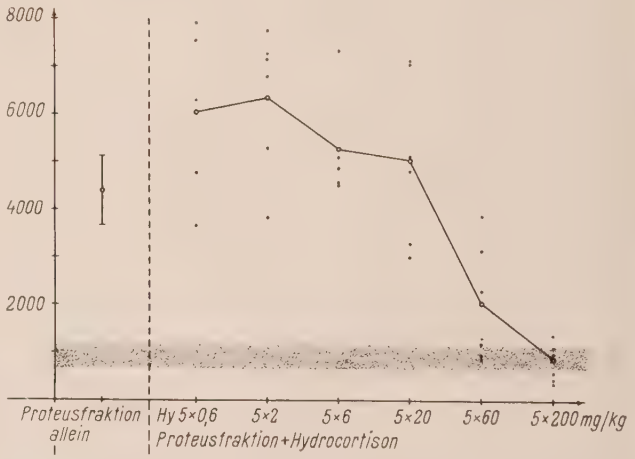


Abb. 2: Wirkung von Hydrocortison auf die durch eine lipopolysaccharidhaltige Proteusfraktion ausgelöste lokale Leukozytenreaktion. Die Tiere erhielten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen Hydrocortison subkutan, gleichzeitig mit der letzten Dosis wurde intraperitoneal 1 mg/kg der Bakterienfraktion gegeben. Untersuchung nach einer Einwirkungsdauer der letzteren von 16–20 h. Links ist der Mittelwert aus Versuchen mit 31 Tieren für die Proteusfraktion allein angegeben

[1] L. Thomas, Ann. N. Y. Acad. Sci. *56*, 799 (1953).
[2] G. Furness, J. Bact. *77*, 461 (1959).
[3] P. Ducommun und S. Ducommun, Ann. Endocrinol *14*, 765 (1953).
[4] H. J. Robinson und A. L. Smith, Ann. N. Y. Acad. Sci. *56*, 757 (1953).
[5] L. Chedid und F. Boyer, Ann. Endocrinol. *14*, 541 (1953).
[6] L. Neipp, W. Kunz und R. Meier, Schweiz. med. Wschr. *89*, 532 (1959).
[7] R. Meier, *Medizinische Grundlagenforschung*, Bd. II (herausgegeben von K. Fr. Bauer, Thieme Verlag, Stuttgart 1959), p. 387.
[8] B. Ecklin, Arch. int. Pharmacodyn, im Druck (1960).
[9] B. Ecklin und R. Meier, Exper. *16*, 112 (1960).

für das Zustandekommen der Leukozytenansammlung eine wichtige Rolle spielen[8,9], spricht dies dafür, dass der Hydrocortisoneffekt über eine Antagonisierung der stimulierenden Wirkung des Lipopolysaccharids auf die Leukozyten zustandekommt.

Die Zeitdauer der Wirksamkeit einer Hydrocortisondosis, bzw. die Zeitdauer bis zum Eintritt der Hydrocortisonwirkung lässt sich mit der gleichen Versuchsanordnung bestimmen. Wird die Hydrocortisonsuspension subkutan appliziert, so wird die leukozytenansammelnde Wirkung der intraperitoneal injizierten Proteusfraktion in folgender Weise beeinflusst:

	Leukozyten pro mm^3 Spülflüssigkeit
Normalwert (freie Zellen der Bauchhöhle am unbehandelten Tier)	915 ± 226
Wirkung der Proteusfraktion (16 h nach Injekt.)	4412 ± 738
Hydrocortison 24 h vor Proteusfraktion-Injekt.	5617 ± 1364
Hydrocortison 8 h vor Proteusfraktion-Injekt.	2940 ± 1447
Hydrocortison 3 h vor Proteusfraktion-Injekt.	2216 ± 1595
Hydrocortison 1 h vor Proteusfraktion-Injekt.	1776 ± 261
Hydrocortison gleichzeitig mit der Proteusfrakt.	1173 ± 665
Hydrocortison 1 h nach Proteusfraktion-Injekt.	1020 ± 302
Hydrocortison 3 h nach Proteusfraktion-Injekt.	1120 ± 247
Hydrocortison 8 h nach Proteusfraktion-Injekt.	3640 ± 622

Hydrocortison, in dieser Form appliziert, besitzt demnach seine Wirkung nur relativ kurze Zeit, 24 h nach Injektion ist sie nicht mehr nachweisbar (in diesem Zeitpunkt scheint die Ansprechbarkeit auf die Proteusfraktion eher verstärkt zu sein). Der Vergleich der Hemmung mit der Zeit/Wirkungskurve des Bakterienextraktes, die ebenfalls nach 3–6 h anzusteigen beginnt und nach etwa 16 h das Maximum erreicht, zeigt, dass der Hydrocortisoneffekt rasch eintritt. Dass die etwa gleichzeitige Injektion (an verschiedenem Ort) von Hydrocortison und Polysaccharidfraktion den stärksten Hemmeffekt gibt, beruht offenbar darauf, dass das Wirkungsmaximum von Hydrocortison etwa zur gleichen Zeit oder etwas früher erreicht wird als das der Polysaccharidfraktion. Bei anderem Wirkungsablauf des einen oder anderen Faktors können naturgemäss andere Relationen für das Wirkungsmaximum auftreten. Die Methode ist somit auch geeignet, über die Wirkungsdauer von Cortisonpräparaten Aufschluss zu geben.

Alle Cortisonderivate mit antirheumatischer Wirkung, die bisher geprüft wurden, zeigen einen analogen Effekt. Desoxycorticosteron dagegen ist in diesem Test unwirksam. Die Befunde sprechen dafür, dass der untersuchte Mechanismus ein wesentlicher Faktor in der Wirkung des Cortisons und seiner Derivate auf die Infektionsresistenz darstellt.

R. Meier und B. Ecklin

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 20. Januar 1960.

Summary

The aggregation of leucocytes provoked in the peritoneal cavity of the white mouse by intraperitoneal injection of living *E. coli* is inhibited by large doses of hydrocortisone. At the same time, the animal's susceptibility to infection is enhanced. The aggregation of leucocytes induced by injection of a bacterial extract containing lipopolysaccharides is inhibited in a similar manner. The effect of hydrocortisone sets in rapidly and subsides within 24 h. The inhibitory effect of hydrocortisone on the lipopolysaccharid effect on leucocytes seems to be an important factor in the influence of hydrocortisone on the infectious process.

Depression of Cone Sensitivity During Dark Adaptation

Göthlin[1] has presented sensory evidence in favour of the view that rods can depress or inhibit cone vision. A larger intensity change was required for the sensation of red in changing from the dark adapted to a moderately light adapted state when the macula was stimulated than when stimulation was restricted to the rod-free area. Experiments on frog eyes yield further evidence in the same sense. According to Granit and Riddell[2], the electroretinogram during dark adaptation fails to respond to changes of illumination even at a rather low frequency (5 stimuli/s) inspite of the fact that the strength of light is far above cone threshold; after light adaptation, the same eye follows stimulus frequencis up to 13/s.

In the present study threshold measurements during dark adaptation were made in frogs by determining the energy of light necessary for a constant electroretinographic response elicited by test lights of 652 mμ (mainly activating cones) and of 435 mμ (mainly activating rods). For a detailed description of the method, see Dodt and Elenius[3]. The frogs were dark adapted for 12 h, then urethane and curare were given and the iris was cut. In order to keep the animal in constant condition oxygen was added. Thresholds were established in the dark-adapted state; then followed light adaptation and afterwards the recovery of the threshold sensitivity was measured at intervals in the dark.

In agreement with sensory work on man (Kohlrausch[4]; Hecht *et al.*[5]) and with microelectrode studies in the frog's eye (Granit[6]; Donner[7]), the threshold variation during dark adaptation was large for lights of short wavelengths and small for lights of long wavelengths. At 1·0 s of dark adaptation the relative energy was about 3·4 log units for 435 mμ and about 1·4 log units for 652 mμ, zero being the value in the dark (Fig.). Thus, the relative difference in energy for the two wave lengths is about 2 log units which corresponds to a full Purkyně shift in the frog.

During the first minutes of dark adaptation, the 'cone phase' of threshold recovery for the test lights 435 and 652 mμ follows an almost parallel course, linear in the double logarithmic plot (Fig.). Then, after about 10 min in the dark, the course of threshold change differs for the two wave lengths. For 435 mμ, the 'cone phase' is followed after a break by a 'rod phase' which completes dark adaptation within about 3 h (Fig., open circles). For 652 mμ, which stimulates cones, the threshold variation follows a different pattern. At 15 min in the dark, the threshold is definitely higher than at 9 min and continues to rise for nearly 1 h (Fig., filled circles). Thereafter the threshold decreases again and runs parallel to the 'rod phase' of 435 mμ until the original sensitivity in the dark is regained.

[1] G. F. Göthlin, Kungl. Svenska Vetenskapsakad. Handl. *58*, No. 1 (1917).

[2] R. Granit and H. A. Riddell, J. Physiol. *81*, 1 (1934).

[3] E. Dodt and V. Elenius, The Second Scandinavian Summer Meeting of Biochemistry, Medical Chemistry, Pharmacology and Physiology (Turku/Åbo 1959).

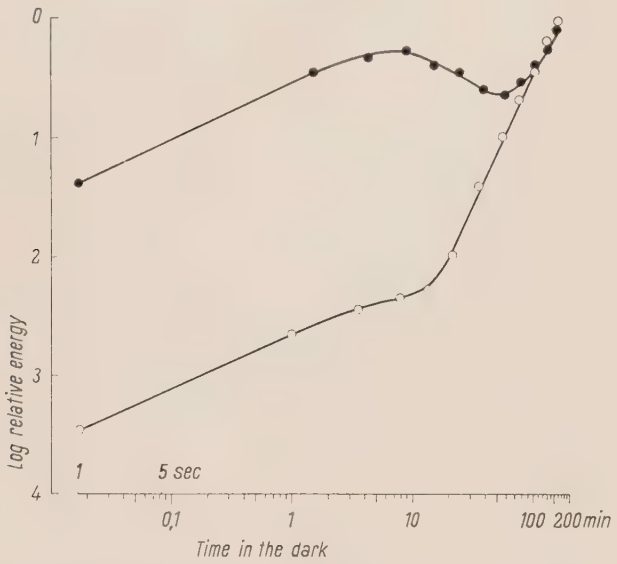
[4] A. Kohlrausch, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *196*, 113 (1922).

[5] S. Hecht, C. Haig, and A. M. Chase, J. gen. Physiol. *20*, 831 (1937).

[6] R. Granit, Acta physiol. scand. *3*, 137 (1941).

[7] K. O. Donner, H. M. S. O. Nat. Physical Lab. Symposium on Visual Problems of Colour, Teddington (1957), Paper No. 20.

Similar results were obtained in 8 experiments, in all of which the threshold for 652 mμ definitely rose at the time when the break in the curve for the blue light occurred. This rise in threshold during the 'cone phase' of dark adaptation was most clearly seen for 652 mμ; in response to 605 mμ the threshold remained fairly constant from the 10th to the 30th min, then the 'rod phase' set in. For test light 693 mμ, the available energy did not suffice for quantitative examination.



Curves showing the change of threshold in the course of dark adaptation in the frog. Temperature maintained at 17°C. Ordinate: log of relative light energy necessary for a constant (20 μV) electroretinographic response. Test light: 435 mμ (open circles), 652 mμ (filled circles). Zero ordinate: energy at threshold as measured in the dark adapted eye. Abszissa: log time in the dark. The beams of light used for testing and for light adaptation both illuminated the same area (1·5 cm in diameter) of white paper placed 8 mm in front of the eye. Light adaptation: white light, duration 15 min, retinal illumination about $5{\cdot}2 \times 10^5$ Trolands. Note the 24-fold decrease of threshold in response to 435 mμ and the 2·4-fold increase of threshold in response to 652 mμ from the 10th to the 60th min of dark adaptation

According to the Figure, the rise of threshold in response to red light coincides with the beginning of the 'rod phase', as shown by the curve for the blue test light. It is tempting, therefore, to correlate the depressed cone sensitivity indicated by the response curve to red light with the incipient activity in rods, evidenced by the rising sensitivity to blue light. Since the break separating cone and rod phases occurs earlier for blue light of 462 mμ than for stimuli of any other wave length, including violet light (unpublished observations of the authors), it may be that the green rods, which absorb heavily in the blue (Denton and Wyllie[8], are the ones responsible for the depression of cone sensitivity during dark adaptation.

The authors are indebted to the Deutsche Forschungsgemeinschaft for support of this work.

E. Dodt und K. H. Jessen

William G. Kerckhoff-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Bad Nauheim, 5. Februar 1960.

Zusammenfassung

Die Änderung der Dunkelempfindlichkeit gegenüber monochromatischem Licht wird am Froschauge nach Helladaptation an 5×10^5 Trolands elektroretinographisch bestimmt. Von der 10. Minute bis zu einer Stunde nimmt die Empfindlichkeit für Rot (652 mμ) um das 2,4fache ab, während jene für Blau (435 mμ) in der gleichen Zeit um das 25fache zunimmt. Da der Abfall der Rotempfindlichkeit zeitlich mit dem Beginn der zweiten Phase der Dunkeladaptation übereinstimmt, wird auf eine Depression der Zapfenerregung durch die Aktivität der Stäbchen geschlossen.

[8] E. J. Denton and J. H. Wyllie, J. Physiol. *127*, 81 (1955).

Elektrophysiologische Analyse der Wirkung von Adrenochrom auf das Kaninchengehirn

Adrenochrom wurde 1937 von Green und Richter[1] in einer Konzentration von 10^{-7} *M* im quergestreiften Muskel nachgewiesen. Das Ferment Phenolase katalysiert seine Bildung aus Adrenalin, und verschiedene experimentelle Beobachtungen sprechen dafür, dass Adrenochrom oder ähnliche Oxydationsprodukte des Adrenalins im Organismus gebildet werden. Adrenochrom verändert das EEG des gesunden Menschen und führt zu psychischen Zustandsveränderungen, wie sie auch bei LSD und Mescalin anzutreffen sind (Hoffer, Osmond und Smythiers[2]).

Wir haben die Wirkung von Adrenochrom auf das Kaninchengehirn elektrophysiologisch analysiert, um sie mit den Effekten anderer halluzinogener Substanzen zu vergleichen.

Methode: An 12 nicht narkotisierten Kaninchen wurde mit der stereotaktischen Methode von Monnier und Gangloff[3] die Wirkung von Adrenochrom[4] auf die folgenden Parameter während 2 h untersucht: 1. Verhalten der Tiere; 2. Atmungs- und Pulsfrequenz; 3. Spontane elektrische Aktivität von Neocortex, Paläocortex und Meso-diencephalon des intakten Gehirns und des «cerveau isolé»; 4. Amplitude und Schwelle der kortikalen Antworten auf elektrische Reizung des Thalamus medialis (intralaminäres System), des Thalamus ventrolateralis (spezifisches thalamo-corticales Projektionssystem), des dorsalen Hippocampus (Paläocortex) und der Substantia reticularis mesencephali mit niedriger Impulsfrequenz (3–4 Hz); 5. Arousal reaction auf Reizung der Substantia reticularis mesencephali mit hoher Impulsfrequenz (150 Hz). Adrenochrom wurde in Dosen von 3,5 und 6 mg/kg i. v. injiziert.

Ergebnisse: Das Verhalten der Versuchstiere wird durch Adrenochrom wenig beeinflusst. Die Kaninchen reagieren aber auf sensorische Reize wie Licht und Lärm stärker.

[1] D. E. Green und D. Richter, Biochem. J. *31*, 596 (1937).

[2] A. Hoffer, H. Osmond und J. Smythiers, J. ment. Sci. *100*, 29 (1954).

[3] M. Monnier und H. Gangloff, *Atlas for Stereotaxic Brain Research on the Conscious Rabbit* (Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1960).

[4] Adrenochrom wurde uns von der Direktion der Firmen Labaz, Bruxelles, und Geigy, Basel, in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Herrn S. Graber danken wir auch bestens für seine technische Mitarbeit.

Veränderungen der Spontanmotilität des frei beweglichen Tieres und des neurovegetativen Verhaltens sind kaum zu beobachten. Höchstens tritt regelmässig eine leichte Abnahme der Herz- und Pulsfrequenz ein; doch ist diese Wirkung flüchtig.

Gleich nach der Injektion des Pharmakons zeigen sich Veränderungen im EEG (Abb. 1). Die Amplitude der spontanen Rhythmen des Neocortex nimmt in allen Ableitungen ab, und die langsamen Aktivitäten des Typus «high voltage slow wave» verschwinden. Gleichzeitig weist der Hippocampus und der Thalamus eine stärkere Synchronisation auf. Demnach ist das EEG im Sinne eines «arousal pattern» verändert, ohne dass aber die Spindeltätigkeit dabei vollkommen verschwindet.

Nach interkollikulärer Dezerebration bewirkt die Injektion von 6 mg/kg Adrenochrom vorübergehend eine neokortikale Desynchronisation mit leichter Synchronisation des Hippocampus. Die Spindelaktivität wird jedoch nicht vollkommen unterdrückt (Abb. 2). Eine partielle Wirkung auf das «cerveau isolé» ist also noch vorhanden.

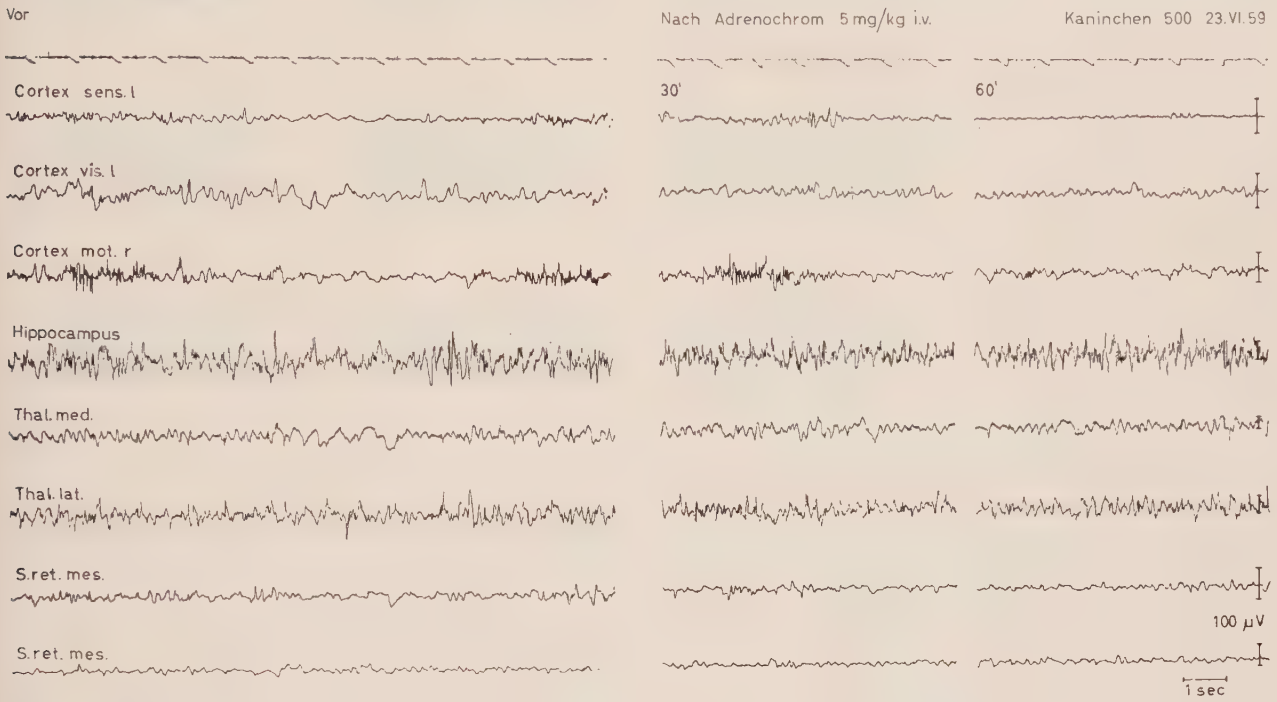


Abb. 1: Wirkung von Adrenochrom (5 mg/kg i. v.) auf die spontane elektrische Aktivität von Cortex und Subcortex. Nach 30 min, besonders aber nach 1 h, zeigt sich ein «arousal pattern» mit Desynchronisation im Neocortex und angedeuteter Synchronisation im Hippocampus und im Mesodienzephalon

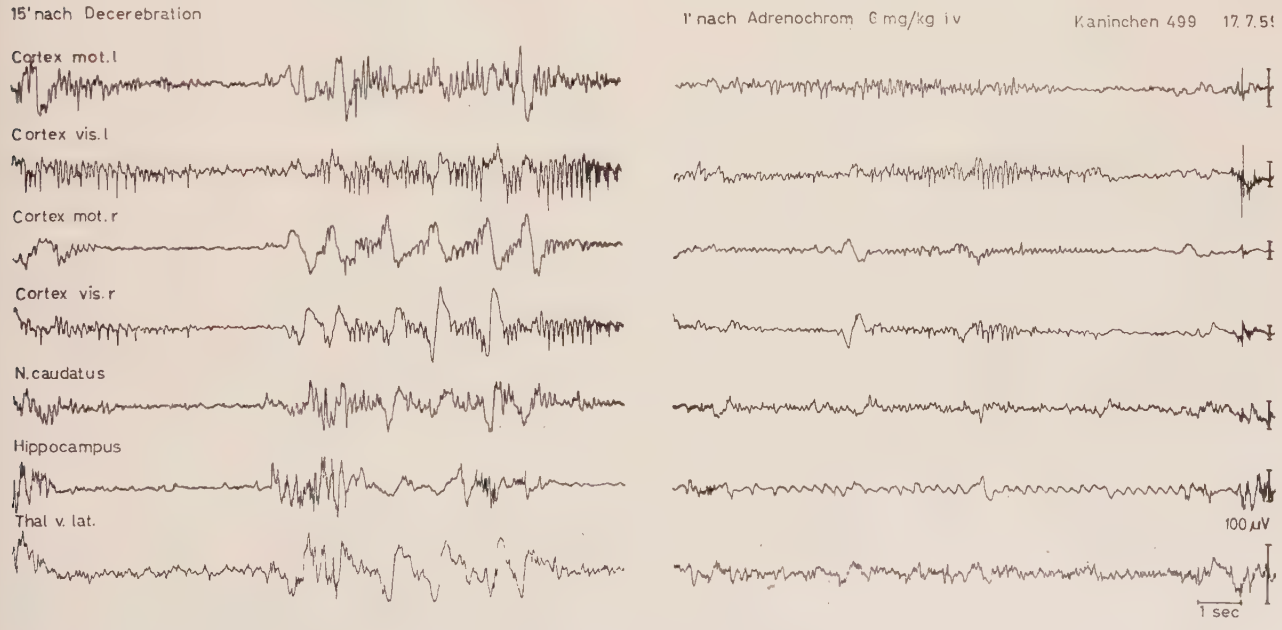


Abb. 2: Adrenochrom (6 mg/kg i. v.) bewirkt am «cerveau isolé» vorübergehend einen leichten Weckeffekt mit Abnahme der langsamen hohen Wellen und der Spindelaktivität. Gleichzeitig zeigt sich im Hippocampus eine Tendenz zur Synchronisation

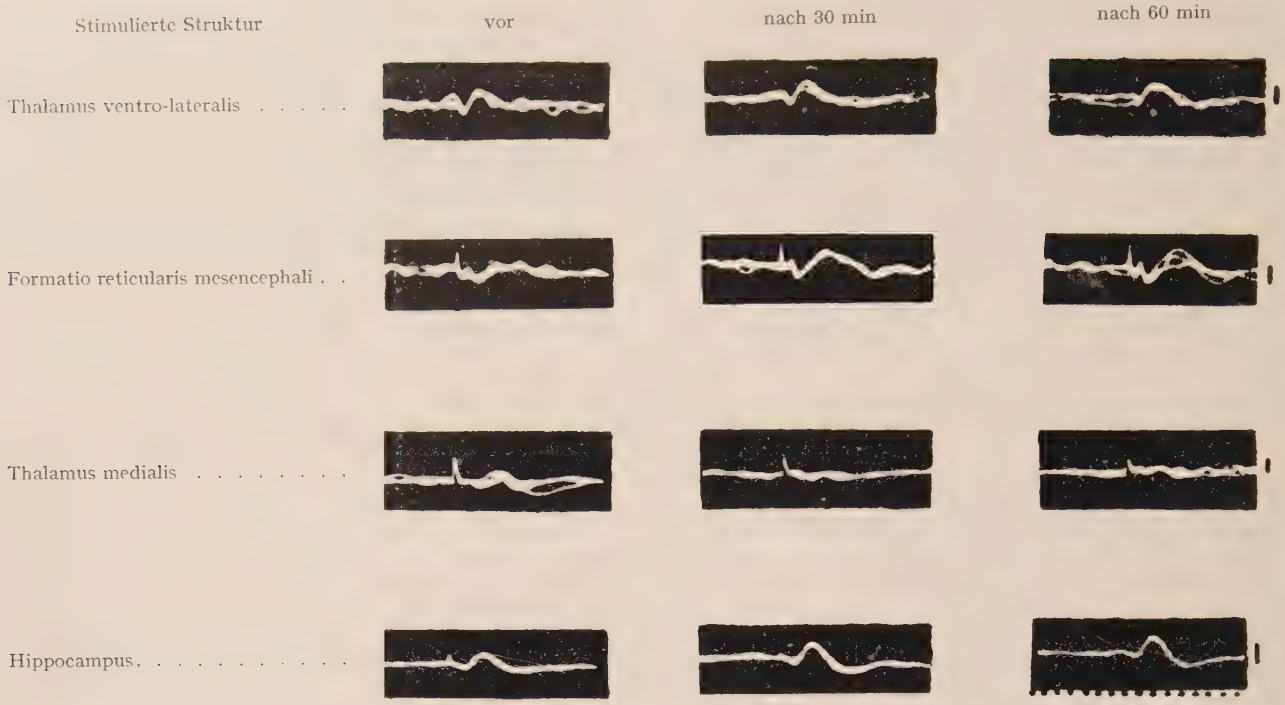

Stimulierte Struktur
vor
nach 30 min
nach 60 min
Thalamus ventro-lateralis . . . . .
Formatio reticularis mesencephali . .
Thalamus medialis . . . . . .
Hippocampus. . . . . .

Abb. 3: Veränderung der Antworten im motorischen Cortex auf Reizung des Thalamus ventro-lateralis, der Formatio reticularis mesencephali, des Thalamus medialis und des Hippocampus unter Adrenochrom (5 mg/kg i. v.). Superposition von 3 Einzelimpulsen, Kalibration 50 µV, Zeit 10 ms

Adrenochrom vermindert die Erregbarkeit des ventrolateralen Thalamus (Beispiel eines spezifischen afferenten Systems), indem die Amplituden der Antworten im somatosensiblen Cortex auf niederfrequente Reizung des ipsilateralen Nucleus ventrolateralis abnehmen.

Die elektrographische Weckreaktion auf sensorische Reize ist unter Adrenochrom gesteigert. Dem entspricht die ebenfalls gesteigerte «arousal reaction» bei elektrischer Stimulation der mesenzephalen Formatio reticularis mittels hoher Impulsfrequenz (150/s). Die Erregbarkeitszunahme der Formatio reticularis mesencephali zeigt sich auch in der leichten Amplitudenzunahme der retikulären Spitzenantworten im Cortex (Abb. 3).

Bei Reizung des intralaminären Systems des medialen Thalamus mit Einzelimpulsen treten im Cortex zwei Antworten unterschiedlicher Latenz auf (Tissot und Monnier[5]). Die erste Antwort kurzer Latenz, welche dem polysynaptischen, thalamischen Teil des aszendierenden retikulären Systems angehört, weist unter Adrenochrom eine leichte Vergrösserung ihrer Amplitude auf (Abb. 3). Dagegen wird die zweite Antwort längerer Latenz, welche der von Dempsey und Morison[6] beschriebenen rekrutierenden Antwort entspricht und durch das rekrutierende diffuse Projektionssystem des Thalamus medialis vermittelt wird, eindeutig kleiner.

Der Hippocampus und seine Verbindungen mit dem Neocortex erfahren durch Adrenochrom eine Erregbarkeitssteigerung, indem die Amplituden der Antworten im Cortex und im Mesodienzephalon auf niederfrequente Reizung des dorsalen Hippocampus zunehmen.

Diskussion: Die halluzinogenen Reizstoffe (LSD, Mescalin und Psilocybin) verändern die spontane elektrische Hirnaktivität in ähnlicher Weise wie Adrenochrom (Monnier[7]). Unter Wirkung dieser Substanzen kommt es am intakten Gehirn des nicht narkotisierten Tieres zu einem mehr oder weniger ausgeprägten «arousal»-Bild im EEG. Im Gegensatz zu LSD aber, das nicht nur zu einer Desynchronisation des Cortex, sondern auch des Subcortex führt, bewirken die drei andern erwähnten Halluzinogene nur eine neokortikale Desynchronisation; der Hippocampus und der Subcortex dagegen weisen eine verstärkte Synchronisation auf. Dieser Effekt ist bei Psilocybin besonders deutlich. Auffallend ist der Unterschied dieser vier Pharmaka in ihrem topischen Verhalten. Am «*encéphale isolé*» wie am «*cerveau isolé*» lässt sich die Weckwirkung von LSD nicht mehr beobachten. Adrenochrom zeigt nur eine vorübergehende geringe Wirkung am «cerveau isolé», während der Effekt von Mescalin und vor allem von Psilocybin auch nach interkollikulärer Dezerebration erhalten bleibt.

Die Aktivität des Hippocampus wird durch die erwähnten Halluzinogene unterschiedlich beeinflusst. Wie Mescalin fördert Adrenochrom die Erregbarkeit dieser paläokortikalen Struktur, löst jedoch keine spontane Entladung aus wie LSD. Psilocybin dagegen vermindert die Aktivität des Paläocortex.

Wenn wir diese kurze vergleichende Zusammenstellung überblicken, so ist ersichtlich, dass LSD, Mescalin, Psilocybin und Adrenochrom trotz gewisser Unterschiede auf manche Strukturen des ZNS qualitativ gleiche Wirkungen auf das spontane EEG entfalten. Da sich aber auch bei andern zentral erregenden Stoffen ähnliche Effekte nachweisen lassen, bleibt die Frage der halluzinogenen Wirkungsmechanismen immer noch unbeantwortet.

P. Krupp und M. Monnier

Physiologisches Institut der Universität Basel, 10. Februar 1960.

[5] R. Tissot und M. Monnier, EEG Clin. Neurophys. *11*, 675 (1959).
[6] E.W. Dempsey und R. S. Morison, Amer. J. Phys. *138*, 238 (1942).
[7] M. Monnier, XXI Int. Congress physiol. Sci., Buenos Aires, Symposia and Special Lectures (1959).

Summary

The action of Adrenochrom on the brain was investigated electrophysiologically on the conscious rabbit. The moderate activation of the somatic behaviour and of the electrical brain-activity can be attributed to an increased activity of the ascending reticular system with simultaneous depression of the medio-thalamic intralaminary recruiting system, as well as to an increased activity of the hippocampus. Specific afferent (somesthetic) systems are only slightly moderated.

Clinical and Biochemical Analysis of Gluten Toxicity I

Dicke *et al.*[1,2] demonstrated that the gliadin component of wheat gluten contained the factor that is toxic in coeliac disease. Subsequently, several research workers[3,4] observed that the omission of gluten from the diet of adult patients with idiopathic steatorrhoea caused the fat absorption coefficient to rise.

Since 1956, we have been engaged in experiments to find out whether a certain amino acid structure of the gliadin is responsible for the toxicity. As a first step, gluten was treated consecutively with gastric juice and duodenal fluid, which were later supplanted by crystalline pepsin and trypsin. It was found that this treatment did not affect the toxicity. Thus, the observations of Frazer *et al.*[5] on children with coeliac disease were confirmed.

The degradation of gliadin (conc. 100 g/2 l dist. water) is carried out at 37°C, first at pH 1–2 for two days with twice 0·5 g pepsin, after which the undissolved part is centrifuged off and the process is continued for two more days at pH 7–8, with the addition of twice 0·5 g trypsin.

The soluble fraction obtained after the enzyme treatment described above was split into an amino acid fraction, an acetone-precipitated fraction, and a residual fraction obtained by evaporation to dryness at 40°C under reduced pressure. Tests on two patients with thrush showed that only the acetone-precipitated fraction was obviously toxic. In view of the special amino acid composition of gliadin, we first isolated the acid peptide fraction from the toxic acetone precipitate by adsorption on alumina. The acid peptide mixture thus obtained was dialysed through a colloid membrane against distilled water and lyophilized.

Administration of the acid peptide fraction in doses corresponding to 24 g wheat gluten per day was found to have a strongly positive effect in two patients with thrush.

With one of the patients, the percentage of non-absorbed fat in the stool, after administration of 1·0 g of the acid peptide fraction, rose from 15 to 81·1% in one day. In the case of the second patient, the percentage of non-absorbed fat in the stool rose, after 0·5 g of the acid peptide fraction had been given for a period of 7 days, and subsequently 1·0 g for 3 days, from 12 to 86%.

Before proceeding further, we wanted to make sure that the mixture of acid peptides derived from the acetone-precipitated fraction of pepsin- and trypsin-treated gliadin consisted of straight chains. Since the amino acid cystine occurs in gliadin and – as demonstrated by two-dimensional paper-chromatography – also in the toxic fractions isolated by us, it is possible that by means of these cystine molecules, sulphur bridges are formed in one or more peptides, which cause ramifications in the molecule, making determination of the structure difficult. Similar structures have been encountered several times, for instance, as the investigations of Sanger have shown, in the hormone insulin.

Following Sanger[6], we treated the acid peptide mixture with performic acid, whereby one molecule cystine, even when it is part of a peptide chain, is converted into two cysteic acid molecules. Although a large portion of the cystine could be converted into cysteic acid in this way, we failed to transform all the cystine present, even though several modifications of the method were applied.

Treatment of the second of the patients mentioned above, with the acid peptide fraktion oxidized with performic acid, showed that this fraction was still highly toxic. After administration of 600 mg of oxidized acid peptides per day for 6 days, the percentage of non-absorbed fat in the stool rose from 15 to 51%.

Hence, it appears that, in spite of the performic acid treatment, the toxic factor is still present.

Since, according to these findings, not all the cystine present in the peptides was oxidized to cysteic acid by our treatment with performic acid, our results cannot yet be attributed to the occurrence of unbranched peptide chains.

J. H. van Roon, A. J. Ch. Haex, W. A. Seeder, and J. de Jong

Department for Gastroenterology, State University Hospital, Leyden (Netherlands) October 21, 1959.

Zusammenfassung

Eine saure Peptid-Fraktion wurde aus dem Weizenprotein Gliadin durch Behandlung mit Pepsin und Trypsin erhalten. Das Verdauungsprodukt wurde durch Präzipitation mit Aceton und Adsorptionschromatographie an saurem Al_2O_3 weiter aufgearbeitet.

Die erhaltene saure Peptid-Fraktion wurde mit Perameisensäure nach dem von Sanger entdeckten Verfahren behandelt. Es wurde festgestellt, dass der in idiopathischer Steatorrhoe toxische Faktor nach dieser Behandlung noch immer vorlag.

[1] W. K. Dicke, H. A. Weijers, and J. H. van de Kamer, Acta paediat. *42*, 34 (1953).

[2] J. H. van de Kamer, H. A. Weijers, and W. K. Dicke, Acta paediat. *42*, 223 (1953).

[3] A. J. Ch. Haex and J. B. Lips, Ned. Tijdschr. Geneesk. *99*, 102 (1955).

[4] J. M. French and C. F. Hawkins, Med. Clin. North Amer. *1957*, 1585.

[5] B. Shaw, A. C. Frazer, C. A. C. Ross, and H. G. Sammons, 3th Int. Biochem. Congr., Brussels (1955), 119.

[6] F. Sanger, Biochem. J. *44*, 126 (1949).

Urinary Excretion of 5-Hydroxyindoleacetic Acid and Histamine in the Pregnant Rat

It was recently observed that in the last third of pregnancy the rat excretes large amounts of histamine in the urine[1]. This increased output of histamine in the mother's urine is probably caused by an increased production of histamine by the fetuses[2]. Various observations indicate that there is a connexion between the content of 5-hydroxy-tryptamine (serotonin) and histamine in some tissues of the rat, possibly because the two amines are in

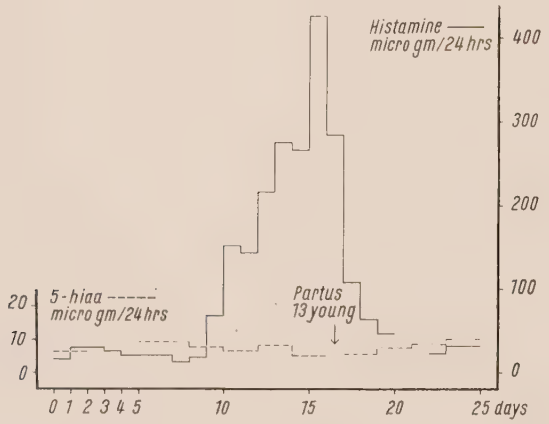
[1] G. Kahlson, Elsa Rosengren, and H. Westling, J. Physiol. *143*, 91 (1958).

[2] G. Kahlson, Elsa Rosengren, H. Westling, and T. White, J. Physiol. *144*, 337 (1958).

part contained in the tissue mast cells[3,4]. It was of interest to study if there was any evidence of similar changes in the production of 5-hydroxytryptamine in the pregnant rat as have been demonstrated for histamine. Therefore, the urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) was followed during rat pregnancy. 5-HIAA is an important metabolic product of 5-hydroxytryptamine[5].

Urine was collected from white rats before, during, and after pregnancy. 5-HIAA was determined spectrophotometrically using the 1-nitroso-2-naphtol reaction[6]. Histamine was determined by bioassay on the guinea pig ileum[1].

The observations on one rat are presented in the Figure. It is evident that there was a marked difference between the excretion of histamine and that of 5-HIAA during and after pregnancy. The former remained unchanged until the 15th day of pregnancy, when it started to increase. The increase was progressive until a peak value was reached on the day before parturition. After parturition the histamine excretion dropped quickly to the normal level. The excretion of 5-HIAA, on the other hand, was stable throughout pregnancy and after parturition.



Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA, interrupted line) and histamine (uninterrupted line) in μg/24 h. Note the increase in histamine excretion starting at day 9–10, which was the 15th day of pregnancy

The urinary excretion of histamine and 5-HIAA behaved essentially as described above in the four rats examined. The table shows the mean values for the daily output of 5-HIAA and histamine during two phases of pregnancy, namely the second week (days 8–14) and the last part (day 15—the day before parturition). A comparison of these mean values shows that there was, for histamine, a 5- to 10-fold increase during the last part of pregnancy, whereas, for 5-HIAA, these was no significant difference between the mean values obtained during the second week and those obtained during the last part of pregnancy. In rat No. 4, the excretion of 5-HIAA was admittedly slightly higher after the 15th day than earlier in pregnancy. However, the excretion of 5-HIAA was still higher after parturition, namely 19·6 μg/24 h (mean of 5 consecutive determinations). It was therefore concluded that the rise in the excretion of 5-HIAA in this rat (No. 4) was not caused by the pregnancy. In the other three rats the excretion of 5-HIAA after parturition was the same as during pregnancy. As indicated in the Table, one rat was adrenalectomized and another one given cortisone during the later part of pregnancy. These procedures did not appreciably modify the increase in histamine excretion from the 15th day on.

Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid and histamine in 4 pregnant rats. The values are given in μg per 24 h and represent the mean value for the specified period of pregnancy. The figures within parentheses denote the number of determinations on which the mean value is based. For methodological reasons, the content of 5-HIAA was usually determined in 2 pooled 24 h urines

Rat No.	5-hydroxyindoleacetic acid		Histamine		No. of young
	Days 8–14	Day 15-day before term	Days 8–14	Day 15-day before term	
1	10·3 (4)	12·8 (5)	30 (7)	145 (8)	7
2	8·6 (4)	6·6 (4)	18 (7)	121 (7)	13
3	7·2 (4)	6·6 (4)	21 (7)	165 (9)	6[a]
4	12·2 (5)	16·8 (8)	27 (7)	274 (9)	7[b]

[a] Adrenalectomized on day 11. [b] Cortisone 5 mg daily from day 9 until 3 days after parturition.

The present observations of an unchanged output of 5-HIAA during rat pregnancy would seem to make it very unlikely that there is an increase in the formation of 5-hydroxytryptamine, comparable to that observed for histamine. This is compatible with recent findings[7] that the histamine produced in the rat fetus is probably not derived from mast cells. It is, however, clear from the few available data[8,9] that only one fourth or one third of exogenous 5-hydroxytryptamine is metabolized to form urinary 5-HIAA in the rat. Inferences about the turnover of 5-hydroxytryptamine in the rat from determinations of the urinary 5-HIAA must therefore be made with caution.

L. Angervall, L. Enerbäck, and H. Westling

Departments of Pathology I and II, and the Department of Clinical Physiology, University of Göteborg (Sweden), September 8, 1959.

Zusammenfassung

Bei schwangeren Ratten wurde die urinäre Ausscheidung von 5-Hydroxyindolessigsäure im Gegensatz zu der von Histamin nicht erhöht. Das deutet darauf hin, dass die Bildung von 5-Hydroxytryptamin nicht wie diejenige von Histamin vermehrt wird.

[3] E. P. Benditt, in *5-Hydroxytryptamine* (Ed. G. P. Lewis, London 1958).

[4] G. P. Lewis, in *5-Hydroxytryptamine* (Ed. G. P. Lewis, London 1958).

[5] H. Blaschko, in *5-Hydroxytryptamine* (Ed. G. P. Lewis, London 1958).

[6] S. Udenfriend, E. Titus, and H. Weissbach, J. biol. Chem. *216*, 499 (1955).

[7] G. Kahlson, Elsa Rosengren, and T. White, J. Physiol. *145*, 30 P (1959).

[8] V. Erspamer, J. Physiol. *127*, 118 (1955).

[9] W. M. McIsaac and I. H. Page, J. biol. Chem. *234*, 858 (1959).

The Relative Metabolic Rates of Norepinephrine-7-H^3 and Epinephrine-1-C^{14}

The availability of DL-norepinephrine-7-H^3 and DL-epinephrine-1-C^{14} makes it possible to study simultaneously the metabolic pathways of these hormones *in vivo*. The extent to which epinephrine and norepinephrine are deaminated, O-methylated, N-methylated or N-demethylated after simultaneous injection has been evaluated in the present study.

A group of rats was injected with 0·5 ml of $1{\cdot}9 \times 10^{-4}$ *M* norepinephrine-7-H^3 and epinephrine-1-C^{14} with a respective activity ratio of 5:1. The urine was collected over a period of 24 h, and hydrolyzed at pH 2 by refluxing at 100°C for 20 min. The hydrolyzed urine extract was cooled to room temperature and extracted 4 times with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction contained the acidic and neutral metabolites. The water layer was passed through an alumina column at pH 8 and the absorbed catechol amines were eluted with 0·2 *N* acetic acid. The effluent of the alumina column contained the methoxycatechol amines, and the eluate of the alumina column contained the catechol amines. The catechol amine and the methoxycatechol amine fractions were acetylated as described previously[1]. Aliquots of all fractions were counted separately in a Packard Tri-Carb scintillation counter by the discriminator ratio method. In each experiment, duplicate samples were counted and averaged, and the ratio of H^3:C^{14} was calculated (Table I). These results show an increase in ratio of H^3:C^{14} in the catechol amine fraction, a decrease of H^3:C^{14} in the methoxycatechol amine fraction and in the ethyl acetate fraction, as compared to the ratio in the injected solution. The nature of these changes in ratios was further studied. By chromatography in the Bush 'C' solvent system[2], two radioactive peaks with the same mobility as acetylated norepinephrine and epinephrine were obtained from the catechol amine fraction, and two radioactive peaks with the same mobility as acetylated 3-methoxynorepinephrine and 3-methoxyepinephrine were obtained from the methoxycatechol amine fraction.

The ethyl acetate fraction was chromatographed in chloroform acetic acid-water (2:1:1), and in isopropyl alcohol-aqueous ammonia-water (8:1:1) solvent system. Two radioactive peaks were obtained. The peak with the slower mobility was identical with 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and the second peak represents an unknown metabolite. This metabolite was demonstrated to be neutral since it was extractable into ethyl acetate but not into sodium bicarbonate. It is readily acetylated and from its mobility in the Bush 'C' solvent system, it appears to be an alcohol. As Table II shows the H^3:C^{14} ratio was found to be the same for 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and the alcohol. This shows that the alcohol is formed from norepinephrine and epinephrine in the same proportion as 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid.

The presence of tritium in the epinephrine and 3-methoxynorepinephrine zones (Table II), indicates that norepinephrine is converted into epinephrine *in vivo*. The absence of C^{14} in the norepinephrine and 3-methoxynorepinephrine zones shows that epinephrine is not demethylated to norepinephrine, and that *N*-methylation of norepinephrine to epinephrine is an irreversible process *in vivo*.

It is evident from the H^3:C^{14} ratio in the epinephrine and 3-methoxyepinephrine zones (Table II), that epinephrine-H^3 which was formed from norepinephrine-H^3 is not O-methylated to the same extent as originally injected epinephrine-C^{14}. The failure of epinephrine-H^3 which was formed *in vivo* to undergo as extensive O-methylation as injected epinephrine-C^{14} may result from the fact that competition for the methyl donor at the metabolic site exists. This finding may also result from the fact that norepinephrine-H^3 and epinephrine-C^{14} were injected simultaneously and therefore epinephrine-H^3 had to be metabolically formed in order to compete with the O-methylation of the injected epinephrine-C^{14}.

Table I: Tritium and C^{14} ratios in catechol amine, methoxycatechol amine, and ethyl acetate fractions [a]

Experiment No.	Catechol Amine H^3/C^{14}	Methoxycatechol Amine H^3/C^{14}	Ethyl Acetate Fraction (Acidic and Neutral Metabolites) H^3/C^{14}
1	7·2/1	4·5/1	3/1 (4·0/1) [c]
2	6·5/1	4·0/1	3·5/1 (4·1/1)
3 [b]	7·0/1	4·6/1	3/1 (4·0/1)

[a] Activity ratio of injected norepinephrine-7-H^3 to epinephrine-C^{14} was 5/1.
[b] The radio chemical purity was also established by extraction of the methoxycatechol amine fraction with ethylene dichloride prior to acetylation[3].
[c] The ratios, in parentheses, were obtained after enzymatic hydrolysis of the urine.

Table II: Tritium and C^{14} total activity of epinephrine, norepinephrine, and their metabolites isolated from rats urine after separation by paper chromatography

	Total activity c. p. m. × 10^4		Ratio of H^3/C^{14}
	H^3	C^{14}	
norepinephrine	37·70	0	
3-methoxynorepinephrine	97·60	0	
epinephrine	16·40	8·40	1·9/1
3-methoxyepinephrine	18·00	29·20	0·61/1
3-methoxy-4-hydroxymandelic acid	8·10	2·00	4·0/1
neutral metabolite [a]	5·1	1·2	4·2/1

[a] A recent publication by AXELROD *et al.*[4], describes a similar compound identified as 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol

M. GOLDSTEIN, A. J. FRIEDHOFF, and G. SANDLER

New York University College of Medicine, Department of Psychiatry and Neurology, Psychopharmacology Research Unit, Neurochemistry Laboratory, New York, January 4, 1960.

Zusammenfassung

Ratten wurden gleichzeitig mit Noradrenalin-H^3 und Adrenalin-C^{14} belastet und die Ausscheidung im Harn verfolgt. Die Analyse der Metabolite hat unter anderem ergeben, dass Noradrenalin-H^3 zu Adrenalin-H^3 verwandelt wird, und dass diese Reaktion irreversibel ist. Das *in vivo* synthetisierte Adrenalin-H^3 wird in geringerem Masse inaktiviert als das injizierte Adrenalin-C^{14}. Ein neutrales Stoffwechselprodukt (wahrscheinlich ein Alkohol) wurde aus dem Harn isoliert.

[1] M. GOLDSTEIN, A. J. FRIEDHOFF, and C. SIMMONS, Exper. *15*, 80 (1959).
[2] I. E. BUSH, Biochem. J. *50*, 370 (1951).
[3] J. AXELROD, S. SENOH, B. WITKOP, J. biol. Chem. *233*, 697 (1958).
[4] J. AXELROD, Biochim. biophys. Acta *36*, 576 (1959).

Effect of Cortisol and Norethandrolone on Inflammation and Tumor Growth[1]

The anti-inflammatory activity of cortisol in rats usually parallels the loss of body, thymus, and adrenal weight[2–4]. Practically all these effects are antagonized by growth hormone and, to a certain extent, desoxycorticosterone and aldosterone[3, 5, 6]. On the other hand, certain anabolic androgens and more especially nortestosterone derivatives can selectively antagonize the body weight loss[7–9]. Hence, it seemed of interest to investigate this antagonism as regards inflammation and tumor growth. The present study deals with the effect of cortisol and norethandrolone upon the inflammatory reaction of croton oil induced granuloma pouches in intact and adrenalectomized rats, and upon the growth of a transplanted fibrosarcoma.

Materials and Methods: 136 female Sprague Dawley (Holtzman) rats, weighing between 100 and 115 g were maintained on Purina Fox Chow and tap water, except for adrenalectomized rats, which received 1% NaCl in their drinking fluid. Hormone treatment was started 3 days before induction of the granuloma pouches or implantation of the tumors. Bilateral adrenalectomies also preceded the production of the pouches by 3 days. Cortisol acetate (Pfizer) was administered at a dose of 1 mg, daily for the first 3 days and every second day thereafter. Norethandrolone (Searle) was given at a daily dose of 5 mg for the duration of the experiment; both steroids were injected subcutaneously as microcrystal suspensions in 0·2 ml of saline. The granuloma pouches were produced with croton oil according to the modified technique of Robert and Nezamis[10], with the difference that 1 ml of irritant was given at a concentration of 0·75%. A methylcholanthrene fibrosarcoma, recently induced in our laboratory, was used as transplantable tumor: 0·2 ml of a cellular suspension, obtained by grinding 1 g of fresh tumor tissue with 5 ml of physiologic saline, was injected underneath the dorsal skin of the rat. A neoplasm, free of necrotic tissue, was taken from a single donor, thus insuring a uniform growth in the receivers. The distribution of groups in each experiment is indicated in the Tables. The first experiment lasted 6 days after the production of the pouches, while the second experiment, on tumor growth, ended 9 days after implantation of the tumors. To assess the inflammatory reaction quantitatively, exudate from the pouches was measured into graduated cylinders at the time of autopsy. The thymus and adrenals, together with the tumors, were fixed into Susa solution for subsequent dissection, weighing, and histologic examination.

Results: *Effect of cortisol and norethandrolone on inflammation in intact and adrenalectomized rats* (Table I). As expected, cortisol decreased, while norethandrolone increased the rate of somatic growth and both hormones antagonized each other in this respect. The rate of exudation in the granuloma pouches did not follow the same pattern and there was no visible antagonism between the steroids;

[1] This work was supported by grant from the National Cancer Institute of Canada. The authors wish to thank Pfizer Canada, Montreal, and G. D. Searle & Co., Chicago, U.S.A. who graciously supplied cortisol acetate and norethandrolene.

[2] H. Selye, Amer. J. Physiol *171*, 381 (1952).
[3] P. Bois and H. Selye, Growth *19*, 107 (1955).
[4] J. Shewell, Brit. J. Pharmacol. *12*, 133 (1957).
[5] G. Jasmin and H. Selye, Ann. Endocrin *13*, 849 (1952).
[6] H. Selye, Science *121*, 368 (1955).
[7] R. Gaunt, C. H. Tuthill, N. Antonchak, and J. H. Leather, Endocrinology *52*, 407 (1953).
[8] G. A. Overbeek and J. De Visser, Acta endocrinol. *24*, 209 (1957).
[9] G. Jasmin and P. Bois, Internat. Rec. Med. *172*, 731 (1959).
[10] A. Robert and J. E. Nezamis, Acta endocrinol. *25*, 105 (1957).

Table I: Effect of Cortisol and Norethandrolone on Inflammation in Intact and Adrenalectomized Rats

Treatment	Final Body Weight (g)[c]	Weight Gain (g)	Exudate (ml)	Thymus (mg)	Adrenals (mg)
Intact[a]	136 ± 1·8[d]	32 ± 1·4	10·4 ± 0·9	328 ± 10·4	36·6 ± 0·8
Intact Cortisol	112 ± 1·5	8 ± 1·9	1·8 ± 0·4	74 ± 7·5	20·9 ± 1·0
Intact Norethandrolone	150 ± 2·3	49 ± 2·2	6·7 ± 0·7	177 ± 7·8	33·3 ± 1·3
Intact Cortisol + Norethandrolone	131 ± 1·5	28 ± 2·1	0·9 ± 0·4	22 ± 1·5	23·5 ± 0·9
Adr-X[b]	128 ± 2·5	+13 ± 3·2	11·7 + 1·0	373 ± 36·1	
Adr-X Cortisol	110 ± 2·4	− 7 ± 1·3	1·5 ± 0·5	59 ± 5·5	
Adr-X Norethandrolone	136 ± 4·5	+21 ± 5·0	8·3 ± 0·2	235 ± 31·6	
Adr-X Cortisol + Norethandrolone	127 ± 2·0	+13 ± 1·8	2·2 ± 0·5	23 + 2·2	

[a] Groups of 10 rats each. [b] Groups of 14 rats each. [c] Calculated after removal of exudate. [d] Mean ± standard error.

Table II: Effect of Cortisol and Norethandrolone on Tumor Growth in Intact Rats

Treatment[a]	Final Body Weight (g)[b]	Weight Gain (g)	Tumor (mg)	Thymus (mg)	Adrenals (mg)
–	156 ± 2·1[c]	+41 ± 2·3	2770 ± 198	308 ± 12·7	43·8 ± 1·6
Cortisol	122 ± 1·7	+ 7 ± 2·0	1591 ± 177	71 ± 6·3	19·3 ± 0·5
Norethandrolone	190 ± 1·5	+75 ± 2·2	2658 ± 249	219 ± 14·7	37·9 ± 0·9
Cortisol + Norethandrolone	147 ± 2·4	+31 ± 2·5	1434 ± 199	27 ± 1·8	23·8 ± 1·1

[a] Groups of 10 rats each. [b] Calculated after removal of the tumor. [c] Mean ± standard error.

norethandrolone even significantly reduced the inflammatory reaction ($p < 0{\cdot}01$). As judged from the thymus weight, both steroids caused lympholysis, although norethandrolone had a much weaker effect than cortisol. The marked atrophy of the adrenal glands caused by cortisol was not significantly influenced by norethandrolone. On the contrary, the latter hormone given alone slightly diminished the adrenal weight, with a reduction in sudanophilia.

Adrenalectomy did not change the animals' response to norethandrolone, even as regards its anabolic property; the loss of body weight caused by cortisol, which is relatively higher after adrenalectomy, was effectively prevented by norethandrolone.

Effect of cortisol and norethandrolone upon the growth of a transplanted fibrosarcoma (Table II). The effects of both hormones on body and thymus weights obtained here are similar to those reported in the previous experiment. The higher gain in body weight is attributable to the longer period of treatment. Tumor weight revealed that the neoplastic growth responded to the steroid treatment exactly as did the inflammatory reaction.

Discussion: Analysis of our results reveals a remarkable degree of uniformity in the responsiveness of intact and adrenalectomized animals to treatment with cortisol and norethandrolone. The remarkable tolerance of adrenalectomized rats for norethandrolone was unexpected, since another anabolic hormone, the pituitary growth hormone, is very toxic in the absence of adrenals[11]; thus, the presence of that gland is not indispensable for the occurrence of tissue anabolism.

It is noteworthy that two somewhat metabolically opposed steroids exerted an additive effect upon the evolution of inflammation and cancer. This influence seems to be a direct one, at least in the case of inflammation, since it is also demonstrable in the absence of adrenals. Like other testoids[12], norethandrolone causes a weak, but direct, involution of the thymus. At the dosage used, the hormone also exhibited progestative properties, with definite hypertrophy of the preputial glands and external genitals; this effect was not prevented by cortisol treatment.

In the present study, the inhibitory action of cortisol upon the growth of the fibrosarcoma was highly significant ($p < 0{\cdot}01$). These results may not agree with other reports[13,14], but the effect of the corticosteroid upon the growth of transplantable tumors largely depends upon the origin of the neoplasm and the modality of treatment[15]. Here, the rate of the tumor growth singularly compares with the reaction of the connective tissue.

These observations may provide useful therapeutic applications, especially when anti-inflammatory corticosteroids are to be administered in high doses and for a prolonged period. In such instances, the conjoint treatment with norethandrolone may be indicated until the advent of a more specific anti-inflammatory steroid.

G. Jasmin*, P. Bois, and A. Mongeau**

Department of Pathological Anatomy, University of Montréal and Department of Histology and Embryology, University of Ottawa (Canada), January 11, 1960.

* Medical Research Associate of the National Research Council of Canada.

** Work done under tenure of a summer fellowship from the Fondation Rhéaume of Montreal (Canada).

Résumé

Le norethandrolone administré chez le rat intact ou surrénalectomisé se montre très efficace à prévenir la perte de poids causée par le cortisol. Cet antagonisme, toutefois, n'est pas démontrable en ce qui concerne l'effet anti-inflammatoire, la diminution de la croissance tumorale et l'atrophie du thymus et de la surrénale dus au cortisol. En outre, le norethandrolone présente à lui seul des propriétés anti-inflammatoires et thymolytiques, plus spécialement chez l'animal intact.

[11] H. Selye, Amer. J. Physiol. *181*, 367 (1955).

[12] J. Schacher, J. S. L. Browne, and H. Selye, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *36*, 488 (1937).

[13] J. Nandi and H. A. Bern, Cancer Res. *18*, 790 (1958).

[14] G. A. H. Buttle, P. F. D'Arcy, E. M. Howard, and D. N. Kellett, Brit. J. Pharmacol. *14*, 307 (1959).

[15] E.-H. Betz, L. Dewart, and F. Piette, Ann. Anat. Path. *4*, 242 (1959).

The Action of 5-Hydroxy-DL-Tryptophan and 5-Hydroxy-Tryptamine on the Cortical Electrical Activity of the 'Midpontine Pretrigeminal Preparation'

In order to study the action of 5-hydroxy-tryptophan (5HTP) and 5-hydroxy-triptamine (5HT) on the central nervous system, we followed the EEG changes induced by these drugs on the midpontine pretrigeminal cat with or without midbrain hemisection. The drugs were injected into the carotid artery. Electro-cortical activity, arterial blood pressure, and carotid blood flow (Rein's Thermostromuhr) were simultaneously recorded.

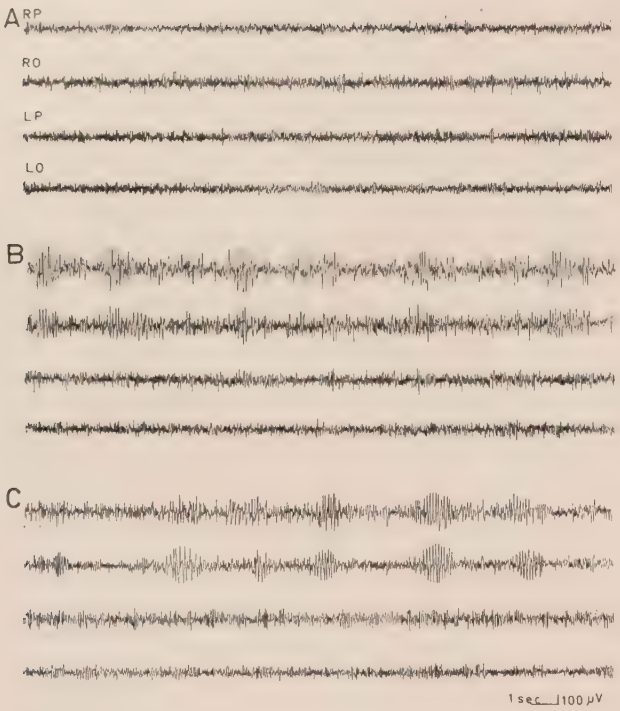
The main results were as follows:

(1) The EEG pattern of the midpontine pretrigeminal preparation is characterized by the low voltage fast rhythms which are considered typical of the waking state[1]. 5HT (2–80 µg) slowly injected into the carotid artery – the controlateral artery being closed – never changed this pattern, neither modified, at least in some of our experiments, the carotid blood flow and the arterial blood pressure.

On the contrary, 5HTP (8–20 mg) injected in the same way, brought about high voltage slow EEG rhythms similar in every respect to those produced by thyopental. This pattern, which lasted more than 30 min, was reversible and was easily activated by olfactory and visual stimulations. In many instances, 5HTP, at doses active on the EEG, was ineffective on the carotid blood flow and the arterial pressure.

(2) 5HTP (8–20 mg) injected into the carotid artery – the controlateral artery being open – yielded a clear EEG asymmetry, the cerebral hemisphere on the side of the injection showing a degree of synchronization more pronounced than the one of the opposite hemisphere (Fig.). This means that the EEG effect of 5HTP (a) is most likely to start just at the first passage of the drug into the cerebral circulation, and (b) must be largely independent of extra-cerebral metabolic products of 5 HTP, which ought to impinge symmetrically upon the nervous structures. At lower dosage (4–8 mg), 5HTP produced a latent asymmetry which was revealed by small doses of thiopental (2–3 mg/kg i. v.) which produced a higher degree of synchronization over the hemisphere ipsilateral to the injection of 5HTP. Whatever the doses of 5HTP used, we never obtained, an EEG asymmetry opposite in sign to that described above.

[1] C. Battini, G. Moruzzi, M. Palestini, G. F. Rossi, and A. Zanchetti, Arch. ital. Biol. *97*, 1 (1959).



Effects of 5HTP on the EEG of the midpontine-pretrigeminal cat.

(A) EEG pattern symmetrically activated, 2 h after midpontine transection.

(B) Clear EEG asymmetry produced by 1 mg of thiopental injected into the right carotid artery, the controlateral artery being open: only the hemisphere on the side of the injection shows synchronization.

(C) The same EEG pattern produced by 20 mg of 5HTP injected as in (B).

(3) The EEG patterns of the midpontine pretrigeminal cat following mesencephalic hemisection have long periods of asymmetry; in fact the hemisphere overlying the section shows marked synchronization, while the other hemisphere is desynchronized[2]. Olfactory stimulation gives an arousal reaction. In this preparation, 5HT (1–4 μg) injected into the carotid artery – the controlateral artery being closed – frequently produced a clear arousal reaction, which ran independent of changes in the cerebral blood flow, at least when they were recorded at carotid level. In contrast, 5HTP (5–10 mg) not only brought about a symmetric synchronization, but it also frequently blocked the arousal reaction from olfactory or visual stimulation.

Our results are in part at variance with those obtained by other research workers (Gangloff and Monnier[3]; Crepax and Infantellina[4]; Mantegazzini[5]; Rothballer[6]; Monnier and Tissot[7]; Costa and Rinaldi[8]).

A full discussion of our results and a tentative explanation of the discrepancies between our data and those of the above mentioned investigators will be given in the paper *in extenso*. It is evident, however, that differences in animal species, route of administration of the drugs, and experimental methods may be responsible for different results and hence for different interpretation of the physiological action of 5HT and 5HTP on the central nervous system.

A. Glässer and P. Mantegazzini

Laboratori Ricerche Farmitalia, Milano (Italia), November 5, 1959.

Riassunto

Il 5HTP, direttamente iniettato nel circolo cerebrale, produce un quadro elettroencefalografico di sonno, indipendente da modificazioni di flusso nel circolo cerebrale e da eventuali metaboliti che si formano al di fuori del cervello. La 5HT, iniettata nelle stesse condizioni, o è senza effetto o dà una reazione elettroencefalografica di risveglio.

[2] J. P. Cordeau and M. Mancia, Arch. ital. Biol. *96*, 374 (1958).
[3] H. Gangloff and M. Monnier, Helv. physiol. Acta *15*, 83 (1957).
[4] P. Crepax and F. Infantellina, Arch. Sci. biol. *41*, 207 (1957).
[5] P. Mantegazzini, Arch. int. Pharmacodyn. *112*, 199 (1957).
[6] A. B. Rothballer, EEG. Clin. Neurophysiol. *9*, 409 (1957).
[7] M. Monnier et R. Tissot, Helv. physiol. Acta *16*, 255 (1958).
[8] E. Costa and F. Rinaldi, Amer. J. Physiol. *196*, 214 (1958).

Glutaminase I Activity in Guinea Pig and Rabbit Liver and Kidney Tissues

Phosphate-activated glutaminase (Glutaminase I) has been demonstrated in rat and mouse brain, spleen, liver and kidney and in brain and spleen of rabbit and guinea pig; but in extracts of guinea pig, rabbit liver, kidney tissue, and of mitochondrial preparations, the phosphate activation of glutaminase activity has as yet not been demonstrated[1]. The object of the present report is to demonstrate glutaminase I activity in guinea pig and rabbit liver and kidney tissues.

Methods: Tissue extracts and mitochondrial preparations were made according to the procedures of Errera *et al.*[1], and the methods of Schneider[2] were followed when sucrose was employed for the preparation of mitochondria. The enzyme activity was determined by measuring the ammonia formed in presence of (5×10^{-3} *M*) L-glutamine (0·05 *M* Veronal Buffer pH 7·2 or 0·05 *M* Veronal Acetate Buffer pH 8·4). Incubations in Warburg's vessel at 37°C for 1 h, ammonia estimated by the method of Braganca *et al.*[3]. Enzyme preparations equivalent to 50 mg of tissue (wet weight) for kidney and 100 mg for liver in all cases.

Results and Discussion: Glutaminase activity of tissue extracts and mitochondrial suspensions of guinea pig and rabbit liver and kidney, as shown in Table I, indicates that phosphate activation is most prominent at pH 7·2, especially with the mitochondrial system. The effect of DL-glutamic acid (Table I) on the enzyme activity in absence of any added phosphate showed a slight inhihtion with kidney tissues, while the liver enzyme was not found to be inhibited in accordance with Krebs[4]. However, in the presence of added phosphate, the inhibition of glutamic acid in all the tissue preparations was most significant. Varied concentration of phosphate showed (not shown in the Table) the phosphate-glutaminase activity curve to assume a flattened plateau after reaching the maximum of the optimal phosphate concentration of 0·2 *M* with no further increase in enzymatic activity.

[1] M. Errera and J. P. Greenstein, J. biol. Chem. *178*, 495 (1949).
[2] W. C. Schneider, in *Manometric Techniques* (Ed. by W. W. Umbriet, R. H. Burris, and J. F. Staufer, Burgess Publishing Co., U.S.A., 1957), p. 188.
[3] B. M. Braganca, J. H. Quastel, and R. Schucher, Arch. Biochem. Biophys. *52*, 18 (1954).
[4] H. A. Krebs, Biochem. J. *29*, 1951 (1935).

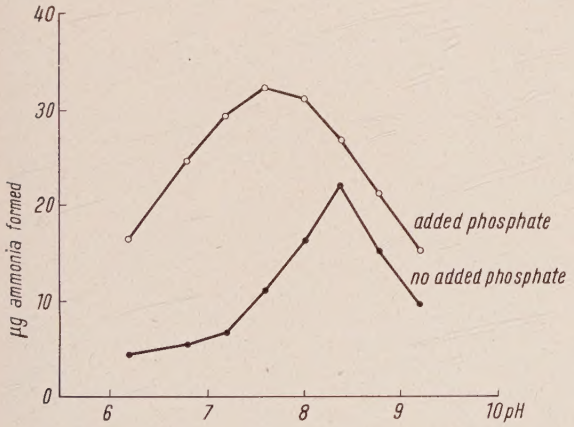
Table I

Glutaminase I activity of guinea pig and rabbit liver and kidney (a) tissue extracts and (b) mitochondrial preparations

Tissue Preparations	Additions	µg Ammonia formed per h at pH 7·2		pH 8·4	
		Preparation (a)	Preparations (b)	Preparation (a)	Preparation (b)
1. Guinea pig Liver	None	12·0	6·2	19·0	22·0
	PO_4	20·0	27·0	19·8	27·0
	DL-glutamate	11·0	6·0	19·0	22·0
	PO_4 + DL-glutamate	16·0	17·0	19·5	23·0
2. Guinea pig Kidney	None	9·0	9·0	18·0	26·5
	PO_4	26·5	28·0	25·0	35·5
	DL-glutamate	6·0	6·0	16·0	26·0
	PO_4 + DL-glutamate	16·0	12·0	15·0	29·0
3. Rabbit Liver	None	7·0	8·0	14·0	17·0
	PO_4	18·0	25·0	20·0	26·5
	DL-glutamate	7·0	8·0	13·0	16·0
	PO_4 + DL-glutamate	11·0	16·0	14·0	20·0
4. Rabbit Kidney	None	6·0	9·0	12·0	13·0
	PO_4	20·0	26·0	22.0	26·0
	DL-glutamate	4·0	7·0	9·0	10·0
	PO_4 + DL glutamate	8·0	18·0	16·0	20·0

0·2 *M* Phosphate and 0·05 *M* DL-glutamate were used. Other conditions are given in the text.

The pH activity curve of glutaminase of guinea pig liver mitochondria (Fig.) indicates that the optimum range for phosphate activation lies between pH 7·2–7·8, and the net effect of phosphate activation decreases as the pH is further raised.



pH-activity curve of Glutaminase I of guinea pig liver mitochondria

It is evident from Table II that the glutaminase of guinea pig liver mitochondria, prepared and suspended in hypertonic sucrose medium, is not activated even at pH 7·2, with the usual phosphate concentration (0·2 *M*). However, a higher concentration of phosphate (0·5 *M*) is required to produce significant activation of glutaminase, which suggests that the effect of phosphate is in some way counteracted by hypertonic sucrose medium.

Table II

Effect of tonicity of medium on Glutaminase I activity of guinea pig liver mitochondria (100 mg wet weight) at pH 7·2

System	µg Ammonia formed per h	
	Without PO_4	With PO_4 (0·2 *M*)
1. Suspension prepared according to Errera *et al.*[1]	6·2	27·0
2. 0·3 *M* Sucrose suspension	15·0	27·0
3. 0·88 *M* Sucrose suspension . . .	16·5	17·0
4. 0·88 *M* Sucrose suspension + 0·5 *M* PO_4 (in place of 0·2 *M*) .	16·5	24·5

Although it is well known that phosphate, glutamic acid, higher pH, or hypertonic sucrose produce profound influences on the structural morphology and function of the mitochondrion, it cannot definitely be said at this stage whether the observed effects of these factors on the glutaminase activity and on the mitochondrial morphology are correlated phenomena.

S. R. Guha and H. S. Chakravarti

Indian Institute for Biochemistry and Experimental Medicine, Calcutta (India), October 12, 1959.

Zusammenfassung

Aktive Glutaminase I wurde in Meerschweinchen- und Kaninchenleber, in Nierengewebsextrakten und in Mitochondrienpräparaten der erwähnten Organe bei pH 7,2 nachgewiesen. DL-Glutaminsäure bewirkte eine ausgesprochene Hemmung des Enzyms nach Zusatz von Phosphat. In hypertonischer Sukrosenährlösung lässt sich eine Aktivierung durch Phosphatzusatz gewöhnlich nicht nachweisen, selbst nicht beim pH-Optimum 7,2, es sei denn bei sehr hohen Phosphatkonzentrationen.

PRO EXPERIMENTIS

A Method for Avoidance of Electrostatic Flashing in Preparing Autoradiographs with Stripping Film

In unusually dry climates static electricity complicates the use of stripping film for autoradiography. Peeling the film from its base, however gently, tends to produce bright flashes which raise the background to intolerable levels unless special precautions are taken to humidify the film or the atmosphere to the proper degree. (If it is too damp, the film cannot be separated from the plate.)

Accurately controlled hydration can be achieved by immersion of the film plate in aqueous alcohol. The following procedure has been found effective: autoradiographic plates (Kodak AR 10) are immersed briefly (15–30 s) in 100% ethanol and then transferred to a shallow dish of 95% ethanol. While submerged, the film is scored with a razor blade into strips of requisite size, the pieces are peeled off and floated on water emulsion-side down in the usual way. The film strips flatten rapidly and can be mounted on slides within a few seconds. The water on which the film is floated must be changed at frequent intervals, because alcohol that is carried over alters the

surface tension and the strips will sink. It is advisable to carry out this procedure only in a well-ventilated dark room.

Autoradiographs with film stripped by the usual method in a humidified dark room and by the ethanol method described above were compared. Duplicate slides were developed after increasing intervals of exposure. Grains appeared over the radioactive sites at approximately parallel rates, and in fact the two types of preparations were indistinguishable.

This method has yielded highly satisfactory results in qualitative studies on biological material. No grain counting has been attempted. It is simple, rapid and requires no special equipment. Preparations of good quality are readily obtainable in areas where atmospheric conditions are unfavorable.

D. Mazia[1] and Nancy L. R. Bucher[2,3]

Department of Zoology, University of California, Berkeley, and John Collins Warren Laboratories of the Huntington Memorial Hospital of Harvard University, at the Massachusetts General Hospital, Boston (Massachusetts), January 25, 1960.

Zusammenfassung

Die Vorbereitung des Films unter einer Alkohol-Wasser-Lösung wird empfohlen, um die störende Belichtung des autoradiographischen «stripping film» durch elektrostatische Entladungen in einer trockenen Atmospäre zu vermeiden.

[1] Supported by a grant from the National Institutes of Health.

[2] Present address: Massachusetts General Hospital, Boston.

[3] Supported by a grant from the American Cancer Society. This is publication No. 972 of the Cancer Commission of Harvard University.

PRO EXPERIMENTIS

Une combinaison chimique de la fertilisine

L'un de nous a montré[1] que lorsqu'on met en contact le sérum d'un lapin avec de l'eau de mer ovulaire d'oursin ou une solution de fertilisine d'extraction trichloracétique[2] en eau de mer, il se forme un trouble pouvant interférer avec d'éventuelles lectures de réactions immunologiques. Or, il a été démontré[3,4] que la fertilisine possède des propriétés proches de celles de l'héparine: d'une part c'est un polyoside estérifié par des groupements SO_4^{--}, d'autre part c'est une antithrombine.

L'un de nous a montré[5,6] qu'en présence de certains cations divalents, dont Ca^{++}, l'héparine et les héparinoïdes de synthèse précipitent sélectivement les β-lipoprotéines sériques. Il nous a paru intéressant de rechercher si la fertilisine précipite également les β-lipoprotéines. Effectivement nous avons constaté qu'une solution de fertilisine de *Psammechinus miliaris* en présence de 0,1 *M* $CaCl_2$ floculе les β-lipoprotéines du sérum de l'homme. La combinaison est mise en évidence par coloration des lipides avec le noir Soudan dans le précipité redissous en présence de citrate et après électrophorèse sur papier.

Cette réaction de la fertilisine nous paraît avoir un certain nombre d'incidences physiologiques:

1° Il est possible que la combinaison fertilisine-Ca^{++}-β-lipoprotéines joue un rôle important au cours de l'agglutination des spermatozoïdes spécifiques notamment par la fertilisine. En effet la présence d'une gaine lipidique dans la tête des spermatozoïdes d'oursins[7,8] rend très vraisemblable une telle hypothèse.

Notons toutefois que l'héparine n'agglutine pas les spermatozoïdes d'oursins en eau de mer; il s'agit problablement d'une question de poids moléculaire, celui de l'héparine étant trop faible dans les conditions de force ionique qui sont celles de l'eau de mer. En effet l'héparine, contrairement à certains héparinoïdes de synthèse, ne précipite les β-lipoprotéines que dans des conditions de force ionique faible[5].

La combinaison fertilisine-protéines basiques spermatiques-phosphatides spermatiques envisagée par l'un de nous[9] interviendrait dans les processus d'agglutination irréversibles décrits en[9].

2° Il nous paraît possible de généraliser la portée de la combinaison polyosides sulfuriques -Ca^{++}-β-lipoprotéines. Heilbrunn et Wilson[10,11] ont montré que l'héparine inhibe la formation du fuseau achromatique; d'après Jahn[12] et Kopac[13], cette inhibition est en faveur de l'hypothèse soulevée par l'un de nous[14] selon laquelle le fuseau achromatique serait constitué par une combinaison entre des protéines basiques nucléaires et des protéines à point isoélectrique acide cytoplasmiques, l'héparine entrant en compétition avec les protéines acides cytoplasmiques. La combinaison des β-lipoprotéines avec les polyosides sulfuriques nous paraît désormais orienter utilement dans une nouvelle voie les recherches sur la constitution du fuseau achromatique.

Un dosage de la fertilisine fondé sur la combinaison chimique que nous venons de mettre en évidence est en cours de réalisation.

B. Rybak et M. Burstein

Département de Zoophysiologie, Faculté des Sciences, Caen et Centre Nationale de Transfusion Sanguine, Paris, le 23 décembre 1959.

Summary

The fertilizin of sea-urchins combines with β-lipoproteins of mammals sera in the presence of calcium ions. It is suggested that a combination of this type occurs *in vivo* during the sperm-fertilizin interaction.

[1] B. Rybak, Bull. Soc. Chim. biol., Paris *31*, 464 (1949).

[2] B. Rybak, C. R. Acad. Sci., Paris *225*, 701 (1947).

[3] E. Vasseur, Acta chim. scand. *2*, 900 (1948).

[4] J. Immers et E. Vasseur, Paris *5*, 124 (1949).

[5] M. Burstein, C. R. Acad. Sci., Exper. *243*, 527 (1956).

[6] M. Burstein et J. Samaille, C. R. Acad. Sci., Paris *241*, 664 (1955).

[7] G. T. Popa, Biol. Bull. *52*, 238 (1927).

[8] O. Tuzet, C. R. Soc. Biol., Paris *109*, 696 (1932).

[9] B. Rybak, Bull. Biol. France et Belge, Suppl. 41 (1957).

[10] L. V. Heilbrunn et W. L. Wilson, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *70*, 179 (1949).

[11] L. V. Heilbrunn et W. L. Wilson, Biol. Bull. *97*, 242 (1949).

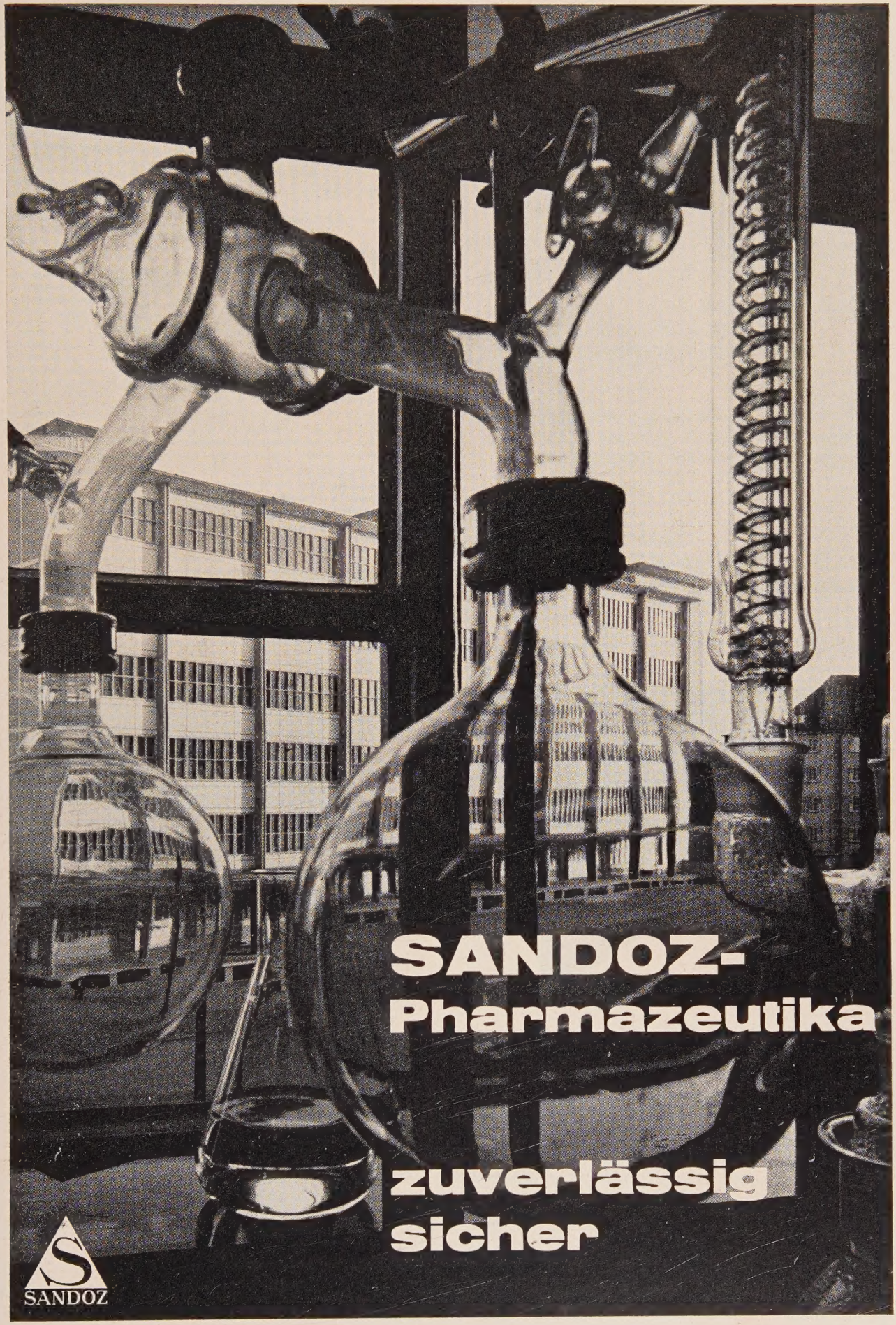
[12] U. Jahn, Z. mikr. anat. Forschung *58*, 37 (1952).

[13] M. Kopac, Ann. Rev. Physiol. *12*, 7 (1950).

[14] B. Rybak, Bull. Soc. Chim. biol., Paris *32*, 703 (1950).

NOTA

Editor's Note: Margaret H. Sherlock, N. Sperber, and J. Topliss: *3-Haloalkyl-Dihydrobenzothiadiazine Dioxides as Potent Diuretic Agents.* A Brief Report on the same subject by de Stevens *et al.* has been received February, 9 and appeared in Exper. *16*, no. 3, p. 113 (1960). For various technical reasons publication on the present report – which definitely has priority – has unfortunately been delayed.


SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

Kynuramine

A NEW MONAMINE OXIDASE STANDARD

A substrate for a more sensitive, accurate and rapid assay of the enzyme.

REFERENCE: H. Weissbach, T. E. Smith, J. Daly, B. Witkop, S. Udenfriend, J. Biol. Chem. *235*, 1160-63 (1960).

Regis Chemical Company now offers Kynuramine Dihydrobromide and has a limited quantity immediately available from stock.

REGIS CHEMICAL COMPANY
1219 N. Wells Street · Chicago 10, Illinois, USA

NEUERSCHEINUNG

Beiträge zur Entwicklung der Physik

Festgabe zum 70. Geburtstag von Professor Paul Scherrer, 3. Februar 1960

Herausgegeben von H. Frauenfelder, Urbana; O. Huber, Fribourg und P. Stähelin, Zürich
254 Seiten, 43 Abbildungen. Preis Fr./DM 18.–
Helvetica Physica Acta, Supplementum V

Inhalt: *K. Alder:* Kernanregung mit geladenen Teilchen. *E. Baldinger:* Elektronik und Kernphysik. *A. S. Bishop:* Controlled Fusion – A Review of the Sherwood Program. *E. Bleuler* und *R. M. Steffen:* Kernspektroskopie. *K. Bleuler:* Zur Struktur der leichten Atomkerne. *F. Bœhm:* Der Betazerfall. *E. Bretscher:* Physics and Nuclear Energy. *P. Debye:* Paul Scherrer und die Streuung von Röntgenstrahlen. *A. De-Shalit:* Nuclear Systematics. *H. Gränicher* und *F. Jona:* Physik des Eises. *H. L. von Gugelberg:* Gasentladungen. *P. C. Gugelot:* Beschleuniger. *E. Heer:* Richtungskorrelation sukzessiver Kernstrahlungen. *G. Herzog:* My Case of Scherrer's Dynamic Influence. *P. Huber:* Neutronenphysik. *W. Känzig:* Die Struktur der Farbzentren in Alkalihalogeniden. *H. Labhart:* Physik in der Chemie. *B. T. Matthias* und *W. J. Merz:* Seignette-Elektrizität. *J. Roussel:* Effets de liaisons moléculaires et cristallines dans la diffusion des neutrons. *H. H. Staub:* Streuung von Röntgenstrahlen. *R. Stössel:* Als Vorlesungsassistent bei Scherrer. *R. Stössel:* Paramagnetismus. *C. G. Suits:* Thoughts About Professor Paul Scherrer. *V. L. Telegdi* and *R. Winston:* A Dynamical Interpretation of the Thomas Precession. *M. Verde:* Phase Shifts and Model Potentials. *H. Wäffler:* Kernphotoprozesse. *W. Zünti:* Kernspaltung und Reaktoren. *F. Zwicky:* Die Erfassung des Weltraumes.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung
Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

UCLAF

synthèses organiques

POUR USAGES

SCIENTIFIQUES
THÉRAPEUTIQUES
INDUSTRIELS
AGRICOLES

uclaf

U-24-PR